

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 04 juillet 2001 (04.07.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02429	Référence du dossier du déposant ou du mandataire B05B3454WO
Date du dépôt international (jour/mois/année) 01 septembre 2000 (01.09.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 01 septembre 1999 (01.09.99)
Déposant MALLET, François etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

23 mars 2001 (23.03.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
 34, chemin des Colombettes
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Tewfik Benyahia (Fax 338.87.40)

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire B05B3454WO	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02429	Date du dépôt international (jour/mois/année) 01/09/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 01/09/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K14/15		
Déposant BIO MERIEUX		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 15 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 6 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☒ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☒ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☒ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 23/03/2001	Date d'achèvement du présent rapport 13.12.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Bladier, C N° de téléphone +49 89 2399 7306 

Formulaire PCT/IPEA/409 (feuille de couverture) (janvier 1994)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

I. Base du rapport.

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-27 version initiale

Revendications, N°:

1-37 reçue(s) le 19/11/2001 avec la lettre du 15/11/2001

Dessins, feuilles:

1/6-6/6 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

3-11, déposées sous couvert d'une lettre du 20.11.2000

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n° :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

II. Priorité

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :

- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
- ☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.

2. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :
voir feuille séparée

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

1. La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☒ les revendications n° 35 partiellement.

parce que :

- ☐ la demande internationale, ou les revendications n° en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n° en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☐ les revendications, ou les revendications n° en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☒ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n° 35 partiellement en question.
2. Le listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas conforme à la norme prévue dans l'annexe C des instructions administratives, de sorte qu'il n'est pas possible d'effectuer un examen préliminaire international significatif :
- ☐ le listage présenté par écrit n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.
- ☐ le listage sous forme déchiffrable par ordinateur n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a
- ☐ limité les revendications.
- ☐ payé des taxes additionnelles.
- ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.
- ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.
2. ☒ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.
3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,
- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
- ☒ Il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
voir feuille séparée
4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :
- ☒ toutes les parties de la demande.
- ☐ les parties relatives aux revendications n° .

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1, 2, 7, 9-13, 16-18, 20, 25, 31
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-22, 25, 30, 31, 35
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-22, 25, 30, 31
	Non : Revendications	

**2. Citations et explications
voir feuille séparée****VI. Certain documents cités****1. Certains documents publiés (règle 70.10)
et / ou****2. Divulgations non écrites (règle 70.9)****voir feuille séparée****VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE**Documents cités**

1. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WANG B. *et al.*, AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, 9(9), 1993, p849-860
- D2: LIN L. *et al.*, PLACENTA, 20(1), janvier 1999, p109-118
- D3: WO 99 02696 A, 21 janvier 1999
- D4: BLOND J.L. *et al.*, JOURNAL OF VIROLOGY, 73(2), février 1999, p1175-1185
- D5: WO 99 26972 A, 3 juin 1999
- D6: TAILOR C.S. *et al.*, JOURNAL OF VIROLOGY, 73(5), mai 1999, p4470-4474
- D7: RASKO J.E.J. *et al.*, PNAS, 96(5), mars 1999, p2129-2134,

Concernant le point I**Base du rapport**

2. Un nouveau jeu de revendications 1-37 a été introduit avec la lettre datée du 15.11.2001.

a) Les revendications 1-22, 25, 30, 31, 35 n'étendent pas l'objet de la demande au-delà du contenu de la demande telle qu'elle a été déposée; elles sont donc conformes à l'Article 34(2)(b) PCT.

b) Les revendications modifiées 23, 24, 26-29, 32-34, 36, 37 ne sont pas conformes à l'Article 34(2)(b) PCT pour les raisons suivantes:
- la revendication 23 vise une utilisation selon la revendication 21 ou 22 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide. Cependant les revendications 21 et 22 concernent une utilisation d'une composition selon la revendication 17, laquelle comprend déjà un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide. Cela signifie donc que l'objet de la revendication 23 concerne une utilisation d'une composition comprenant deux

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

promoteurs hétérologues ou autologues ainsi qu'un ou plusieurs composés indéterminés (en raison de l'emploi du terme 'en outre'). Aucune base n'est trouvée dans la demande originale pour cette modification. Elle étend donc l'objet de la demande au-delà du contenu de la demande telle qu'elle a été déposée.

- l'objet de la **revendication 24** visait originellement une utilisation d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans une quelconque des revendications 1 à 9 dans un vecteur de thérapie. Il vise maintenant une utilisation d'une composition selon les revendications 21 ou 22 caractérisée en ce que ledit gène ou acide nucléique ou ledit fragment de gène est intégré dans un vecteur de thérapie. Il s'agit d'un changement d'objet pour lequel aucune base n'est trouvée dans la demande originale. Cette modification étend donc l'objet de la demande au-delà du contenu de la demande telle qu'elle a été déposée.

- la **revendication 26** vise un vecteur de thérapie rétroviral de type MLV, un vecteur lentiviral pseudotypés par une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8. Toutefois la revendication 26 est dépendante de la revendication 25 visant un vecteur thérapie génique dont le polypeptide est restreint au polypeptide selon la revendication 7 ou 8. La dépendance de la revendication 26 n'est donc pas correcte et ladite revendication inacceptable. La même objection s'applique aux **revendications 27 et 28** qui font référence à la revendication 26.

- La **revendication 29** n'incorpore pas seulement les caractéristiques des revendications 29 et 30 originales mais élargit leur objet. La composition thérapeutique n'est pas uniquement constituée d'un vecteur cellulaire mais comprend d'autres composés indéterminés ('comprend entre autres'), et le vecteur cellulaire n'est pas uniquement constitué d'une cellule exprimant une protéine telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1-9 mais comprend d'autres composés indéterminés (le terme 'comprend' pouvant être interprété comme 'contenant', 'incluant'). Aucune base n'est trouvée dans la demande originale pour une telle extension.

- la **revendication 32** vise l'utilisation d'un ligand pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement du cancer par destruction des cellules au moyen de formation de syncytia. Aucune base n'est trouvée dans la demande originale pour cette modification. Le paragraphe p14 lignes 11-18 mentionne l'utilisation d'un ligand dans une composition thérapeutique dans le but spécifique d'obtenir une inhibition de la formation de syncytia et non dans le but d'utiliser la

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

formation de syncytia pour détruire les cellules cancéreuses. La même objection s'applique à l'objet de la **revendication 33**, et à l'objet de la **revendication 34** qui dépend de la revendication 32 et 33.

- la **revendication 36** vise l'utilisation d'un gène d'intérêt thérapeutique codant pour un ligand pour l'obtention d'un médicament destiné (1) à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou (2) à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie. Il n'y a pas de base dans la demande telle que déposée pour l'option (2). Les passages de la description page 8 ligne 3-7 et page 12 ligne 16-25 constituent uniquement une base pour l'option (1).

- L'objet de la **revendication 37** visait originellement un vecteur de thérapie comprenant à sa surface le récepteur de la protéine de SEQ ID N°1 pour cibler des cellules produisant la protéine identifiée en SEQ ID N°1 de façon constitutive ou induite. Il vise maintenant l'utilisation dudit récepteur pour obtenir un vecteur de thérapie génique destiné à cibler des cellules produisant la protéine identifiée en SEQ ID N°1 de façon constitutive ou induite. Il peut s'agir d'un vecteur de thérapie comprenant à sa surface ledit récepteur comme d'un vecteur de thérapie génique ne comprenant pas à sa surface ledit récepteur. Il y a donc extension de l'objet de la revendication 37 et aucune base n'est trouvée dans la demande originale pour cette extension.

En conséquence lesdites revendications 23, 24, 26-29, 32-34, 36, 37 ne sont pas acceptables et aucune opinion ne sera formulée quant à leur objet. Ce rapport est donc établi uniquement sur la base des **revendications 1-22, 25, 30, 31, 35**.

Concernant le point II**Priorité**

3. Après analyse de la présente demande, il a été trouvé que les dates de priorité ne sont pas valablement revendiquées pour toutes les revendications. En effet, l'objet des **revendications 7, 8** concerne le domaine transmembranaire et cytoplasmique (fragment 448-538 de la SEQ ID N°1) du polypeptide *env* du virus HERV-W. Or cet objet est supporté par de nouveaux résultats expérimentaux (exemple 4) qui ne sont pas présents dans les documents de priorité. Les dates de priorité P1 et P2 ne sont donc pas valables pour les revendications 7-8, 12-20,

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

25 et pour la partie des revendications 9-11, 21-22, 30, 31 qui fait référence à ces revendications. Les différentes revendications ont donc les dates suivantes:

P1(01.09.1999): revendications 1-4 (complètes), revendications 9-11, 21-22, 30 (partielles)

P2(15.09.1999): revendications 5, 6, 35 (complètes), revendication 31 (partielle)

Date de dépôt: revendications 7-8, 12-20, 25 (complètes), revendications 9-11, 21-22, 30, 31 (partielles)

Concernant le point III

Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

4. Toutes les parties de la **revendication 35** n'ont pas été recherchées en raison d'un manque de fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou d'un manque d'exposé au sens de l'Article 5 PCT. En conséquence, la présente opinion ne concerne que les parties de la revendication 35 qui ont été recherchées (Règle 66.1(e) PCT) c'est à dire:
- les parties ayant trait au récepteur hATB°.
 - les parties ayant trait aux anticorps monoclonaux, polyclonaux ou transmembranaires dirigés contre le récepteur hATB° du polypeptide de SEQ ID N°1.

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

5. La demande de brevet présente un défaut d'unité d'invention au sens de la Règle 13 PCT.

L'ensemble des revendications a une seule caractéristique en commun: 'un fragment du polypeptide de SEQ ID N°1 codé par un fragment du gène *env* du rétrovirus endogène HERV-W'. Cette caractéristique n'est clairement pas nouvelle, étant divulguée, par exemple, dans les documents D3, D4 et D5 (cf

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

point V paragraphes 7-9 ci-dessous). Donc, aucun 'élément technique particulier' (Règle 13.2 PCT) n'est présent entre les différentes revendications. Lesdites revendications ne sont donc pas liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général (Règle 13.1 PCT). Malgré cette objection, le demandeur n'est pas invité à payer des taxes additionnelles. Toutefois cette objection sera suivie par l'IPEA dans le cas où le dossier serait poursuivi en phase régionale devant l'OEB.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Nouveauté - Article 33(2) PCT

6. L'emploi des termes 'fragment de SEQ ID N°1 d'au moins cinq acides aminés' (revendication 1 ligne 7), 'fragment de SEQ ID N°1' (revendication 1 ligne 10), et l'absence de spécification de la longueur de la séquence SEQ ID N°1 ou de la longueur de la séquence 448-538 de la SEQ ID N°1 avec laquelle les suites de 20 acides aminés ont 80, 90 ou 95% d'identité (revendications 1, 2, 7) élargissent l'objet desdites revendications à des procédés de détection de protéines n'ayant aucun rapport avec la protéine de la présente demande.
- Par exemple:
- un fragment de SEQ ID N°1 d'au moins 5 acides aminés' peut être le fragment 'lfgpci' (position 464-468 de SEQ ID N°1). Ce fragment existe dans la séquence polypeptide de la protéine *env* du rétrovirus HTLV-II (position 457-462, voir document D1, Figure 3B).
 - une suite de 20 acides aminés ayant 80, 90 ou 95% d'identité avec la séquence SEQ ID N°1 (ou la séquence 448-538 de la SEQ ID N°1) peut être interprétée comme une suite de 20 acides aminés ayant 80, 90 ou 95% d'identité avec 20 acides aminés de la SEQ ID N°1 (ou de la séquence 448-538 de la SEQ ID N°1) ou avec 2 acides aminés de la SEQ ID N°1 (ou de la séquence 448-538 de la SEQ ID N°1). Ainsi un polypeptide qui comprend une séquence présentant pour toute suite de 20 acides aminés au moins 80, 90 ou 95% d'identité avec 2 acides aminés de la SEQ ID N°1 (ou de la séquence 448-538 de la SEQ ID N°1) peut

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

être le polypeptide *env* des rétrovirus HTLV-II ou ERV-3 (voir document D1 et D2).

- une suite de 20 acides aminés ayant 80, 90 ou 95% d'identité avec un fragment de SEQ ID N°1 peut être interprété comme une suite de 20 acides aminés ayant 80, 90 ou 95% d'identité avec un fragment de 20 acides aminés ou avec un fragment de 2 acides aminés de SEQ ID N°1. Ainsi un polypeptide qui comprend une séquence présentant pour toute suite de 20 acides aminés 80, 90 ou 95% d'identité avec un fragment de 2 acides aminés de SEQ ID N°1 peut être le polypeptide de la protéine *env* des rétrovirus HTLV-II ou ERV-3 (voir document D1 et D2).

En conséquence, l'objet des **revendications 1, 2, 7, 9-11** est anticipé par les documents D1 et D2 décrivant des procédés de détection du pouvoir fusogène de la protéine *env* des rétrovirus HTLV-II et ERV-3 par la mise en évidence de la formation de syncytia (D1, voir p853, col. de gauche, paragraphe 1 à p854, col. de gauche dernier paragraphe, tab. 1-3; D2 voir p113 col. de droite, paragraphe 3 à p114 col. de gauche paragraphe 1, fig. 5 et 6).

7. Le document D3 concerne un matériel nucléique de type génomique rétroviral, au moins partiellement fonctionnel comprenant une séquence nucléotidique de référence, notamment la séquence SEQ ID N°11 codant pour la protéine *env* du rétrovirus humain endogène HERV-W (p6, rev1). Il concerne également un fragment nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique partielle de la SEQ ID N°11 (rev7). Il concerne également un vecteur de répllication desdits séquence et fragment (rev12, p7 l25-27); une application thérapeutique de ladite séquence ou de ladite protéine ainsi qu'une composition thérapeutique comprenant ladite séquence ou ladite protéine (rev20 et p8 l35 à p9 l4). Le document D3 est donc préjudiciable à la nouveauté des **revendications 12, 16-18, 20, 25, 31** (Article 33(2) PCT).

8. Le document D4 décrit la caractérisation de la protéine *env* du rétrovirus humain endogène HERV-W déduite à partir de trois clones d'ADNc placentaires (p1180 col. de droite, 2ème paragraphe et fig. 7). Le document D4 anticipe donc aussi l'objet des **revendications 16-18, 20, 25, 31** (Article 33(2) PCT).

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

9. Le document D5 concerne l'identification d'un clone d'ADNc AJ172_2 ayant la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 codant pour la protéine *env* de SEQ ID N°4 du rétrovirus humain endogène HERV-W (p29 l21 à p30 l24). Il décrit également l'expression recombinante de ladite protéine au moyen d'un vecteur d'expression (p49 l14-29), l'utilisation de ladite séquence nucléotidique/protéine ou de ses fragments pour la préparation de compositions thérapeutiques, pour la thérapie génique, pour le traitement du cancer, et pour l'identification de ligands (p52 l10-29, p69 l10-18, p76 l6-10, rev13-15). Le document D5 est donc préjudiciable à la nouveauté des **revendications 12, 13, 16-20, 25, 31** (Article 33(2) PCT).

Il est à noter que l'objection de nouveauté des revendications 12 et 13 est due à l'emploi du terme 'fragment'. Un fragment d'un acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini dans la revendication 8 peut être interprété (1) comme un fragment nucléique codant pour un polypeptide qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID N°1, (2) comme n'importe quel fragment dudit acide nucléique, fragment ne codant pas pour un polypeptide qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID N°1. L'option (2) est anticipé par les documents D3 et D5.

Activité inventive - Article 33(3) PCT

12. L'objet des **revendications 3-6, 8** n'est trouvé dans l'état de la technique mis à la disposition de l'IPEA. L'objet de ces revendications est donc nouveau conformément à l'Article 33(2) PCT. Toutefois il n'implique pas d'activité inventive telle que définie par l'Article 33(3) PCT pour la raison suivante:

Les documents D1 et D2, qui peuvent être considérés indifféremment comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de ces revendications, décrivent un procédé dans lequel on détecte le pouvoir fusogène de la protéine *env* des rétrovirus HTLV-II et ERV-3 (et par la-même l'expression de ces protéines) par la mise en évidence de la formation de syncytia (D1, p853, col. de gauche, paragraphe 1 à p854, col. de gauche dernier paragraphe, tab.1-3, D2 p113 col. de droite, paragraphe 3 à p114 col. de gauche paragraphe 1, fig.5 et 6).

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

Par conséquent, l'objet des revendications 3-6 diffère de l'objet de D1/D2 en ce que la protéine dont on détecte l'expression est la protéine *env* du rétrovirus HERV-W au lieu d'être la protéine *env* des rétrovirus apparentés HTLV-II et ERV-3.

Aucun effet technique n'est associé à cette différence.

Le seul problème que se propose de résoudre la présente demande est donc de fournir une protéine *env* alternative avec un pouvoir fusogène.

La solution à ce problème proposée par la présente demande est la protéine *env* du rétrovirus HERV-W.

Les documents D3 et D4 suggèrent la capacité fusogène de la protéine *env* du rétrovirus HERV-W: D3 observe l'expression restreinte de l'enveloppe de HERV-W au niveau du placenta et évoque la possibilité d'un rôle fusogénique de ladite *env* au niveau des sous-types cellulaires du placenta (p3 l17-19); D4 évoque un rôle de ladite protéine dans la formation du tissu syncytiotrophoblast du placenta (p1184 l3-4), c'est à dire dans la formation de syncytia à partir des cellules du cytotrophoblast. Par conséquent, l'IPEA considère qu'il serait évident pour l'homme du métier de considérer la possibilité de combiner l'enseignement du document D3 ou D4 avec l'état de la technique le plus proche D1/D2 pour résoudre le problème posé. En d'autres termes, il serait évident au vu de l'enseignement de D3 et D4 de penser à tester, et cela avec une espérance de réussite raisonnable, le pouvoir fusogène de la protéine *env* du rétrovirus HERV-W. Par ailleurs, cette protéine *env* alternative ne possède aucun effet ou propriété inattendue qui n'aurait pu être prévu par l'homme du métier. En conséquence l'objet **des revendications 3-6** n'implique pas d'activité inventive telle que définie par l'Article 33 PCT.

Concernant l'objet de la **revendication 8** c'est à dire le domaine transmembranaire et cytoplasmique de la protéine *env* d'HERV-W, il est à noter que, bien que son implication dans le rôle fusogène d'*env* soit nouvelle, cet objet n'est pas considéré comme inventif car déterminer les domaines de ladite protéine impliqués dans le pouvoir fusogène relève de démarches techniques de

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

routine pour l'homme du métier, d'autant plus que la position des domaines luminale, transmembranaire et cytoplasmique de ladite protéine est révélée dans l'art antérieur (cf documents D3 et D4).

13. L'objet des revendications d'utilisation et de procédé 14, 15, 21, 22, 30 et 35 est conforme au critère de nouveauté défini par l'Article 33(2) PCT. Cependant étant donné que l'art antérieur D3 et D4 divulgue le rôle fusogénique de la protéine *env* du rétrovirus HERV-W au niveau du placenta, et qu'identifier les domaines de ladite protéine impliqués dans la capacité fusogène ne dépasse pas les connaissances et compétences normales de l'homme du métier, l'IPEA considère que son application thérapeutique n'implique pas d'activité inventive telle que définie par l'Article 33(3) PCT.

Concernant le point VI**Certains documents cités**

14. Certains documents publiés (règle 70.10)

Demande n° Brevet n°	Date de publication (jour/mois/année)	Date de dépôt (jour/mois/année)	Date de priorité (valablement revendiquée) (jour/mois/année)
WO99/60020	25.11.1999	17.05.1999	18.05.1998 20.10.1998

L'attention de la demanderesse est attiré sur le fait que le document WO99/60020 sera considéré comme art antérieur dans certains Etats contractants du PCT. L'OEB, par exemple, considèrera ce document comme préjudicial à la nouveauté de l'objet de la présente demande (Articles 54(3) et (4) EPC) dans la mesure où les mêmes Etats contractants sont désignés (voir page 25 l7-22, page 28 l29 à page 29 l25, exemple 1).

Concernant le point VIII**Observations relatives à la demande internationale**

15. Dans les revendications 1, 12, 16, 18, 21, 22, 31, le terme 'fragment' est imprécis car il ne définit ni la taille, ni la position du fragment. Il englobe donc un

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/02429

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

nombre infini de possibilités et étend la protection demandée à des protéines/gènes n'ayant aucun rapport avec ceux de la présente demande. Par conséquent, lesdites revendications ne satisfont pas aux conditions requises à l'Article 6 PCT (manque de clarté, manque de fondement).

15. Dans les **revendications 1, 2, 5, 7**, l'absence de spécification de la longueur de la séquence avec laquelle les suites de 20 acides aminés ont 80, 90 ou 95% d'identité élargit également la protection demandée à des protéines n'ayant aucun rapport avec la protéine de la présente demande (Article 6 PCT, manque de clarté, manque de fondement).
16. Le terme 'ligand' (**revendication 35**) est vague et imprécis et laisse un doute quant à l'étendue de la protection demandée car il définit le composé par sa fonction et non par ses caractéristiques structurelles. Ce mode de définition ne fait pas référence un composé ou groupe de composés précis mais englobe un nombre infini de composés pouvant avoir des compositions chimiques très différentes. Par conséquent, l'objet de ladite **revendication** ne satisfait pas aux conditions requises à l'Article 6 PCT (manque de clarté, manque de fondement).
17. Les expressions 'au moins', 'en outre', 'entre autres' (**revendications 17-20, 31**) sont vagues et imprécises et laissent un doute quant à l'étendue de la protection demandée (Article 6 PCT).

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide
5 d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, caractérisé en ce que la protéine ou le
polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID
NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1 d'au moins cinq acides aminés ou une
séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence
au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou
10 avec un fragment de SEQ ID NO :1, et en ce qu'on détecte le pouvoir fusogène de ladite
protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture
cellulaire, par la mise en évidence de la formation de syncytia.

2. Procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide
d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, caractérisé en ce que la protéine ou le
15 polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20
acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95%
d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1, et en ce qu'on détecte le pouvoir fusogène de
ladite protéine dans des cellules d'un tissu cellulaire, ou d'une culture cellulaire par la
mise en évidence de la formation de syncytia.

20 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la protéine
est codée par le gène *env* du rétrovirus endogène HERV-W.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la protéine est
codée par un cadre de lecture ouvert situé sur le chromosome 7 du génome humain.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la protéine
25 présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés,
au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la
séquence SEQ ID NO:1.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la protéine
présente une séquence polypeptidique qui consiste en SEQ ID NO:1.

30 7. Procédé selon le revendication 1, caractérisé en ce que le polypeptide
présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés,

au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO:1.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le polypeptide
5 présente une séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO : 1.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules dudit tissu ou de ladite culture cellulaire sont choisies parmi les cellules osseuses, les cellules musculaires, les cellules placentaires, les cellules
10 endothéliales, en particulier des vaisseaux sanguins, les cellules épithéliales, les cellules gliales et les cellules tumorales ou issues de lignées cellulaires tumorales.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la détection du pouvoir fusogène de ladite protéine consiste à :

obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel
15 l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort,

transfecter des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine, et

observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

20 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la détection du pouvoir fusogène de la protéine consiste à :

obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel
l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort,

25 transfecter des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine,

co-cultiver des cellules naïves indicatrices exprimant à leur surface un récepteur de ladite protéine en présence desdites cellules productrices, et

observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

30 12. Utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis

dans la revendication 8, dans des conditions appropriées permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique.

13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement de cancers.

5 14. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en, ce que ladite composition est destinée à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

10 15. Utilisation selon la revendication 12, 13 ou 14, caractérisée en ce que la composition est destinée à un traitement par thérapie génique.

16. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini dans la revendication 7 ou 8.

15 17. Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

18. Vecteur d'expression comprenant au moins un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini dans la revendication 7 ou 8, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte.

20 19. Cellule hôte comprenant au moins un vecteur selon la revendication 18.

20. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression selon la revendication 18.

25 21. Utilisation d'une composition selon la revendication 16, 17 ou 20, ou d'une composition comprenant comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tel que défini à la revendication à l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de cancers par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia.

30 22. Utilisation d'une composition selon la revendication 16, 17 ou 20, ou d'une composition comprenant comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tel

que défini à la revendication à l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

5 23. Utilisation selon la revendication 21 ou 22, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

24. Utilisation selon la revendication 21 ou 22, caractérisée en ce que ledit gène ou acide nucléique ou ledit fragment de gène ou d'acide nucléique est intégré dans
10 un vecteur de thérapie génique.

25. Vecteur de thérapie génique comprenant un polypeptide tel que défini à la revendication 7 ou 8.

26. Vecteur selon la revendication 25, choisi parmi un vecteur rétroviral de type MLV, un vecteur lentiviral pseudotypés par une protéine ou un polypeptide tel que
15 défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, un vecteur synthétique.

27. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de thérapie tel que défini dans l'une des revendications 25 et 26 et une séquence d'acide nucléique ou un oligonucléotide anti-sens.

28. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de
20 thérapie tel que défini dans l'une des revendications 25 et 26 et un gène d'intérêt thérapeutique.

29. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur cellulaire comprenant une cellule exprimant une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

25 30. Procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses ou de systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, selon lequel on met en contact ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-drogue avec des
30 cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, on observe une régression ou une disparition dans la formation de syncytia.

31. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, une séquence d'acide nucléique ou un oligonucléotide anti-sens susceptible de s'hybrider à un gène ou un fragment de gène ou à un acide nucléique ou fragment d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8.

32. Utilisation d'un ligand susceptible de reconnaître et de se lier au récepteur de la protéine définie en SEQ ID NO :1, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de cancers par destruction des cellules cancéreuses au moyen de formation de syncytia.

33. Utilisation d'un ligand susceptible de reconnaître et de se lier au récepteur de la protéine définie en SEQ ID NO:1, pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

34. Utilisation selon la revendication 32 ou 33, caractérisée en ce que le un ligand choisi parmi un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un anticorps transmembranaire ou un fragment desdits anticorps, une molécule inhibitrice, ledit ligand étant spécifique du récepteur de la protéine définie en SEQ ID NO : 1.

35. Utilisation d'un gène d'intérêt thérapeutique codant pour un ligand susceptible de reconnaître et de se lier au récepteur de la protéine définie en SEQ ID NO:1, et étant placé sous le contrôle des éléments nécessaires pour assurer son expression *in vivo*, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de cancers par destruction des cellules cancéreuses au moyen de formation de syncytia.

36. Utilisation d'un gène d'intérêt thérapeutique codant pour un ligand susceptible de reconnaître et de se lier au récepteur de la protéine définie en SEQ ID NO:1, et étant placé sous le contrôle des éléments nécessaires pour assurer son expression *in vivo*, pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

37. Utilisation du récepteur de la protéine identifiée en SEQ ID NO :1, pour obtenir un vecteur de thérapie génique destiné à cibler des cellules produisant la protéine identifiée en SEQ ID NO :1 de façon constitutive ou induite.

5

FEUILLE MODIFIÉE

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B05B3454W0	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02429	Date du dépôt international (jour/mois/année) 01/09/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 01/09/1999
Déposant BIO MERIEUX		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 7 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☒ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrége**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrége est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☒ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

5

☐ Aucune des figures n'est à publier.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

La revendication 33 présente a trait une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour une petite partie des composés. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est-à-dire les parties ayant trait au polypeptide de SEQ ID NO:1 ou aux fragments dudit polypeptide.

Les revendications 34-37 présentes ont trait une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour une petite partie des composés. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est-à-dire les parties ayant trait au polypeptide RDR1/ATBo, qui est le récepteur de retrovirus du type D et aussi un transportateur de acides aminées neutrales (ATBo) (voir exemple 3).

La revendication 34 présente ont trait une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour une petite partie des composés. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est-à-dire les parties ayant trait au polypeptide de SEQ ID NO:1, aux anticorps monoclonaux, polyclonaux ou transmembranaires dirigés contre le récepteur du polypeptide de SEQ ID NO:1 (le polypeptide RDR1/ATBo)

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PC 00/02429

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K14/15 C12N15/48
A61K48/00 C12N5/10

A61P35/00

A61P15/00

A61K39/21

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, EMBL, GENSEQ, MEDLINE, SCISEARCH, CHEM ABS Data, BIOTECHNOLOGY ABS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 02696 A (BIO MERIEUX ; BESEME FREDERIC (FR); BLOND JEAN LUC (FR); BOUTON OLI) 21 janvier 1999 (1999-01-21)	13, 15-21, 23-31, 33,34
Y	page 8, ligne 35 -page 9, ligne 4 revendications 12,20 page 3, ligne 17-19	1-6, 10-12, 22,23,32
	---	-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ALCONADA RODRIG., A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BLOND JEAN-LUC ET AL: "Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 2, février 1999 (1999-02), pages 1175-1185, XP000946152 ISSN: 0022-538X page 1184, colonne de gauche page 1180, colonne de droite, alinéa 2; figure 7</p>	<p>13, 15-21, 23-31, 33,34</p>
X	<p>--- WO 99 26972 A (GENETICS INST) 3 juin 1999 (1999-06-03)</p> <p>page 29, ligne 21 -page 30, ligne 26 page 49, ligne 14-29 page 52, ligne 10-29 page 69, ligne 10-18 page 76, ligne 6-10</p>	<p>13,14, 16-21, 24-31, 33,34</p>
X	<p>--- TAILOR CHETANKUMAR S ET AL: "A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 5, mai 1999 (1999-05), pages 4470-4474, XP002148313 ISSN: 0022-538X page 4472, colonne de gauche, dernier alinéa -colonne de droite, alinéa 1; tableau 1</p>	<p>37</p>
X	<p>--- RASKO JOHN E J ET AL: "The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 5, 2 mars 1999 (1999-03-02), pages 2129-2134, XP002148314 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>37</p>

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>WANG BIN ET AL: "Molecular cloning, expression, and biological characterization of an HTLV-II envelope glycoprotein: HIV-1 expression is permissive for HTLV-II-induced cell fusion." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 9, no. 9, 1993, pages 849-860, XP000925933 ISSN: 0889-2229 page 853, colonne de gauche, alinéa 1 -page 854, colonne de gauche, dernier alinéa; tableaux 1-3</p>	1-6, 10-12, 22,23,32
Y	<p>--- LIN L ET AL: "Expression of endogenous retrovirus ERV-3 induces differentiation in BeWo, a choriocarcinoma model of human placental trophoblast." PLACENTA, vol. 20, no. 1, janvier 1999 (1999-01), pages 109-118, XP000925932 ISSN: 0143-4004 page 113, colonne de droite, alinéa 3 -page 114, colonne de gauche, alinéa 1; figures 5,6</p>	1-6, 10-12, 22,23,32
Y	<p>--- DORANZ B J ET AL: "A SMALL-MOLECULE INHIBITOR DIRECTED AGAINST THE CHEMOKINE RECEPTOR CXCR4 PREVENTS ITS USE AS AN HIV-1 CORECEPTOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 186, no. 8, 20 octobre 1997 (1997-10-20), pages 1395-1400, XP000669413 ISSN: 0022-1007 page 1397, colonne de droite, alinéa 2; figure 3</p>	32
P,X	<p>--- AVISSAR N E ET AL: "Characterization of antibodies to intestinal Na⁺ dependent neural amino acid transporter (BO)." GASTROENTEROLOGY, vol. 118, no. 4 Suppl. 2 Part 1, avril 2000 (2000-04), page A69 XP000946467 101st Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and the Digestive Disease Week.; San Diego, California, USA; May 21-24, 2000 ISSN: 0016-5085 abrégé</p>	34-36
	<p>--- -/--</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT 00/02429

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>VOISSET CECILE ET AL: "Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family."</p> <p>AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 16, no. 8, 20 mai 2000 (2000-05-20), pages 731-740, XP000925926</p> <p>ISSN: 0889-2229</p> <p>page 736, colonne de droite, alinéa 3</p> <p>-page 737, colonne de gauche, alinéa 2; figures 1,4</p> <p>page 738, colonne de droite, alinéa 2</p> <p>---</p>	<p>1-6, 10-13, 15-34</p>
P,X	<p>MI SHA ET AL: "Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis."</p> <p>NATURE (LONDON), vol. 403, no. 6771, 17 février 2000 (2000-02-17), pages 785-789, XP002147935</p> <p>ISSN: 0028-0836</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	<p>1-6, 10-34</p>
P,X	<p>BLOND JEAN-LUC ET AL: "An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor."</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 7, avril 2000 (2000-04), pages 3321-3329, XP000946327</p> <p>ISSN: 0022-538X</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	<p>1-6, 10-34</p>
P,X	<p>WO 99 60020 A (GENETICS INST)</p> <p>25 novembre 1999 (1999-11-25)</p> <p>page 25, ligne 7 - ligne 22</p> <p>page 28, ligne 29 -page 29, ligne 25</p> <p>exemple 1</p> <p>-----</p>	<p>1-6, 10-13, 15-34</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT 00/02429

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9902696 A	21-01-1999	AU 8447098 A EP 1000158 A	08-02-1999 17-05-2000
WO 9926972 A	03-06-1999	AU 1417899 A EP 1032593 A AU 4189999 A WO 9960020 A	15-06-1999 06-09-2000 06-12-1999 25-11-1999
WO 9960020 A	25-11-1999	AU 1417899 A AU 4189999 A EP 1032593 A WO 9926972 A	15-06-1999 06-12-1999 06-09-2000 03-06-1999

Translation

PATENT COOPERATION T TY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/069883

Applicant's or agent's file reference B05B3454WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02429	International filing date (day/month/year) 01 September 2000 (01.09.00)	Priority date (day/month/year) 01 September 1999 (01.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/15,		
Applicant BIO MERIEUX		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 15 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☒ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 March 2001 (23.03.01)	Date of completion of this report 13 December 2001 (13.12.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02429

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description: _____, as originally filed
 pages _____ 1-27 _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
 pages _____
- ☒ the claims: _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____ 1-37 _____, filed with the letter of 15 November 2001 (15.11.2001)
 pages _____
- ☒ the drawings: _____, as originally filed
 pages _____ 1/6 - 6/6 _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
 pages _____
- ☒ the sequence listing part of the description: _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____ 3-11 _____, filed with the letter of 20 November 2000 (20.11.2000)
 pages _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02429

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
 - ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See Annex

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02429

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 35 Partially

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02429

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See Annex

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02429

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO 99 / 60020	25 November 1999 (25.11.1999)	17 May 1999 (17.05.1999)	18 May 1998 (18.05.1998)
			20 October 1998 (20.10.1998)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02429

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*

A new set of Claims 1-37 was submitted with the letter dated 15.11.2001.

(a) **Claims 1-22, 25, 30, 31 and 35** do not extend the subject matter of the application beyond the content of the application as filed. They therefore comply with PCT Article 34(2)(b).

(b) **Amended Claims 23, 24, 26-29, 32-34, 36 and 37** do not comply with PCT Article 34(2)(b) for the following reasons.

- **Claim 23** covers a use as per Claim 21 or 22, characterised in that it further comprises an autologous or, preferably, heterologous promoter, for the expression of said protein or said polypeptide. However, Claims 21 and 22 concern a use of a composition as per Claim 17, which already comprises an autologous or, preferably, heterologous promoter for the expression of said protein or said polypeptide. This means, therefore, that the subject matter of Claim 23 concerns a use of a composition comprising two heterologous or autologous promoters, as well as one or a plurality of undetermined (due to the use of the term "further") components. It therefore extends the subject matter of the application beyond the content of the application as filed.
- The subject matter of **Claim 24** originally covered a use of a protein or a polypeptide as defined in any one of Claims 1-9 in a therapy vector. It now covers a use of a composition as per Claims 21 or 22 characterised in that the said gene or nucleic acid, or the said gene fragment is integrated in a therapy vector. This constitutes a

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

change of subject matter for which no basis has been found in the original application. This amendment therefore extends the subject matter of the application beyond the content of the application as filed.

- **Claim 26** covers an MLV-type retroviral therapy vector, a protein or polypeptide pseudotyped lentiviral vector such as defined in any one of Claims 1-8. However, Claim 26 is dependent on Claim 25 which covers a gene therapy vector whereof the polypeptide is limited to the polypeptide as per Claim 7 or 8. The dependence of Claim 26 is therefore incorrect and the said claim is unacceptable. The same objection applies to **Claims 27 and 28**, which refer to Claim 26.

- **Claim 29** not only comprises the features of the original Claims 29 and 30 but broadens their subject matter. The therapeutic composition not only consists of a cellular vector, it comprises other undetermined compounds ('comprises among others'), and the cellular vector not only consists of a cell expressing a protein such as defined in any one of Claims 1-9, but comprises other undetermined compounds (the term 'comprises' can be understood to mean 'containing', 'including'). No basis has been found in the original application for such an extension.

- **Claim 32** covers the use of a ligand to obtain a drug for treating cancer by destroying cells by means of forming syncytia. No basis has been found in the original application for this amendment. The paragraph on page 14, lines 11-18 mentions using a ligand in a therapeutic composition for the specific purpose of inhibiting the formation of syncytia, and not for the

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*

purpose of using the formation of syncytia to destroy cancerous cells. The same objection applies to the subject matter of **Claim 33** and to the subject matter of **Claim 34**, which is dependent on Claims 32 and 33.

- **Claim 36** covers the use of a gene of therapeutic interest coding for a ligand to obtain a drug to (1) prevent a deficiency in development of the placenta or (2) prevent a deficiency in the natural formation of any other type of syncytia, said deficiency being associated with a pathology. There is no basis in the application as filed for option (2). Page 8, lines 3-7 and page 12, lines 16-25 of the description only constitute a basis for option (1).

- The subject matter of **Claim 37** originally covered a therapy vector comprising the receptor of the protein of SEQ ID N°1 on its surface for targeting cells producing the protein identified in SEQ ID N°1 in a constitutive or induced fashion. It now covers the use of said receptor for obtaining a gene therapy vector for targeting cells producing the protein identified in SEQ ID N°1 in a constitutive or induced fashion. This may be a therapy vector comprising said receptor on its surface, or a gene therapy vector not comprising said receptor on its surface. The subject matter of Claim 37 has therefore been extended, and no basis has been found in the original application for this extension.

Consequently said Claims 23, 24, 26-29, 32-34, 36 and 37 are not acceptable and no opinion has been formulated about their subject matter. This report is therefore established only on the basis of **Claims 1-22, 25, 30, 31**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02429

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

and 35.

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

After analysing the present application, it was found that the priority dates are not validly claimed for all the claims. Thus the subject matter of **Claims 7 and 8** concerns the transmembrane and cytoplasmic domain (fragment 448-538 of SEQ ID N°1) of the env polypeptide of virus HERV-W. This subject matter is, however, supported by new experimental results (Example 4) which are not present in the priority documents. The priority dates P1 and P2 are therefore not valid for Claims 7-8, 12-20 and 25 and of that part of Claims 9-11, 21-22, 30, 31 which refers to these claims. The various claims thus have the following dates:

P2 (15.09.1999): (the whole of) Claims 5, 6, 35, (part of) Claim 31

Filing date: (the whole of) Claims 7-8, 12-20, 25, (part of) Claims 9-11, 21-22, 30 and 31.

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Not all the parts of **Claim 35** have been searched due to a lack of support within the meaning of PCT Article 6 and/or a lack of disclosure within the meaning of PCT Article 5. Therefore, the present opinion concerns only those parts of Claim 35 which have been searched (PCT Rule 66.1(e)), that is:

- the parts concerning the hATB^o receptor
- the parts concerning monoclonal, polyclonal or transmembrane antibodies directed against the hATB^o receptor of the polypeptide of SEQ ID N°1.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

The patent application lacks unity of invention within the meaning of PCT Article 13.

The set of claims has one single feature in common: 'a fragment of SEQ ID N°1 coded by an env gene fragment of the endogenous retrovirus HERV-W.' This feature is clearly not novel, being disclosed, for example, in documents D3, D4 and D5 (cf. Box V, paragraphs 7-9 below). Therefore, there is no 'special technical feature' (PCT Rule 13.2) among the various claims. The said claims are therefore not so linked among themselves as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13.1). In spite of this objection, the applicant is not required to pay additional fees. However, this objection will be pursued by the International Preliminary Examination Authority if the file is taken into the regional phase before the EPO.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1, 2, 7, 9-13, 16-18, 20, 25, 31	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-22, 25, 30, 31, 35	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-22, 25, 30, 31	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

- D1: WANG B *et al.*, AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, 9(9), 1993, pages 849-860
D2: LIN L. *et al.*, PLACENTA, 20(1), January 1999, pages 109-118
D3: WO 99 02696 A, 21 January 1999
D4: BLOND J.L. *et al.*, JOURNAL OF VIROLOGY, 73(2), February 1999, pages 1175-1185
D5: WO 99 26972 A, 3 June 1999
D6: TAILOR C.S. *et al.*, JOURNAL OF VIROLOGY, 73(5), May 1999, pages 4470-4474
D7: RASKO J.E.J. *et al.*, PNAS, 96(5), March 1999, pages 2129-2134

Novelty - PCT Article 33(2)

- By using the terms 'SEQ ID N°1 fragment of at least five amino acids' (Claim 1, line 7), 'SEQ ID N°1 fragment' (Claim 1, line 10), and not specifying the length of SEQ ID N°1 or the length of the 448-538 sequence of SEQ ID N°1 with which the successions of 20 amino acids have 80, 90 or 95% identity (Claims 1, 2, 7), the subject matter of said claims is

broadened to methods for detecting proteins unrelated in any way to the protein of the present application.

For example:

- a SEQ ID N°1 fragment of at least 5 amino acids can be the 'lfgpci' fragment (position 464-468 of SEQ ID N°1). This fragment exists in the polypeptide sequence of the env protein of retrovirus HTLV-II (position 457-462, see document D1, Figure 3B).
- a succession of 20 amino acids having 80, 90 or 95% identity with the SEQ ID N°1 sequence (or the 448-538 sequence of SEQ ID N°1) can be understood as a succession of 20 amino acids having 80, 90 or 95% identity with 2 amino acids of SEQ ID N°1 (or of sequence 448-538 of sequence SEQ ID N°1) or with 2 amino acids of SEQ ID N°1 (or of sequence 448-538 of SEQ ID N°1). Thus, a polypeptide which comprises a sequence having, for every succession of 20 amino acids, at least 80, 90 or 95% identity with 2 amino acids of SEQ ID N°1 (or of sequence 448-538 of SEQ ID N°1) can be the env polypeptide of retroviruses HTLV-II or ERV-3 (see document D1 and D2).
- a succession of 20 amino acids having 80, 90 or 95% identity with a fragment of SEQ ID N°1 can be understood as a succession of 20 amino acids having 80, 90 or 95% identity with a fragment of 20 amino acids or with a fragment of 2 amino acids of SEQ ID N°1. Thus, a polypeptide which comprises a sequence having, for every succession of 20 amino acids, 80, 90 or 95% identity with a fragment of 2 amino acids of SEQ ID N°1 can be the polypeptide of the env protein of retroviruses HTLV-II or ERV-3 (see document D1 and D2).

Therefore, the subject matter of **Claims 1, 2, 7 and 9-11** is anticipated by documents D1 and D2, which describe methods for detecting the fusogenic capacity of the env protein of retroviruses HTLV-II and ERV-3 by demonstrating the formation of syncytia (D1, see page 853, left column, paragraph 1 to page 854, left column, last paragraph, Tables 1-3; D2, see page 113, right column, paragraph 3 to page 114, left column, paragraph 1, Figures 5 and 6).

2. Document D3 concerns a nucleic material of the retroviral genomic type, at least partly functional, comprising a nucleotide reference sequence, in particular sequence SEQ ID N°11 coding for the env protein of the human endogenous retrovirus HERV-W (page 6, Claim 1). It also concerns a nucleotide fragment comprising a partial nucleotide sequence of SEQ ID N°11 (Claim 7). It also concerns a replication vector of the said sequence and fragment (Claim 12, page 7, lines 25-27), a therapeutic application of the said sequence or of the said protein as well as a therapeutic composition comprising the said sequence or the said protein (Claim 20 and page 8, line 35 to page 9, line 14). Document D3 is therefore prejudicial to the novelty of **Claims 12, 16-18, 20, 25 and 31** (PCT Article 33(2)).
3. Document D4 describes the feature of the env protein of the human endogenous retrovirus HERV-W deduced from three placental cDNA clones (page 1180, right column, 2nd paragraph and Figure 7). Document D4 therefore also anticipates the subject matter of **Claims 16-18, 20, 25 and 31** (PCT Article 33(2)).

4. Document D5 concerns the identification of a clone of cDNA AJ172_2 having the nucleotide sequence SEQ ID N°3 coding for the env protein of SEQ ID N°4 of the human endogenous retrovirus HERV-W (page 29, line 21 to page 30, line 24). It also describes the recombinant expression of the said protein by means of an expression vector (page 49, lines 14-29), the use of the said nucleotide/protein sequence or of its fragments for preparing therapeutic compositions, for gene therapy, for treating cancer, and for identifying ligands (page 52, lines 10-29, page 69, lines 10-18, page 76, lines 6-10, Claims 13-15). Document D5 is therefore prejudicial to the novelty of **Claims 12, 13, 16-20, 25 and 31** (PCT Article 33(2)).

It should be noted that the objection concerning the novelty of Claims 12 and 13 is due to the use of the term 'fragment'. A fragment of a nucleic acid coding for a polypeptide as defined in Claim 8 can be understood (1) as a nucleic fragment coding for a polypeptide which starts at amino acid 448 and finishes at amino acid 538 of SEQ ID N°1, (2) as any fragment of the said nucleic acid, said fragment not coding for a polypeptide which starts at amino acid 448 and ends at amino acid 538 of SEQ ID N°1. Option (2) is anticipated by documents D3 and D5.

Inventive step - PCT Article 33(3)

5. The subject matter of **Claims 3-6 and 8** was not found in the prior art available to the International Preliminary Examining Authority. The subject matter of these claims is therefore novel in accordance with PCT Article 33(2). However, it does not

involve an inventive step as defined by PCT Article 33(3), for the following reason.

Documents D1 and D2, either of which may be considered the prior art closest to the subject matter of these claims, describe a method whereby the fusogenic capacity of the env protein of retroviruses HTLV-II and ERV-3 (and the expression of these proteins) is detected by demonstrating the formation of syncytia (D1, page 853, left column, paragraph 1 to page 854, left column, last paragraph, Tables 1-3; D2, page 113, right column, paragraph 3 to page 114, left column, paragraph 1, Figures 5 and 6).

Therefore, the subject matter of Claims 3-6 differs from the subject matter of D1/D2 in that the protein whereof the expression is detected is the env protein of the retrovirus HERV-W instead of the env protein of the related retroviruses HTLV-II and ERV-3.

No technical effect is associated with this difference.

The only problem which the present application sets out to solve is, therefore, the provision of an alternative env protein having a fusogenic capacity.

The solution to this problem proposed by the present application is the env protein of the retrovirus HERV-W.

Documents D3 and D4 suggest the fusogenic capacity of the env protein of the retrovirus HERV-W: D3

observes the limited expression of the HERV-W envelope in the placenta and considers the possibility of a fusogenic role of the said env in the cellular subtypes of the placenta (page 3, lines 17-19); D4 considers a role of the said protein in the formation of the syncytiotrophoblast tissue of the placenta (page 1184, lines 3-4), i.e. in the formation of syncytia from cells of the cytotrophoblast. The IPEA therefore considers that it would be obvious to a person skilled in the art to consider combining the teaching of document D3 or D4 with the closest prior art D1/D2 to solve the stated problem. In other words, it would be obvious in view of the teaching of D3 and D4 to think of testing the fusogenic capacity of the env protein of retrovirus HERV-W, and to do so with a reasonable expectation of success. Moreover, this alternative env protein does not have any unexpected effect or property which could not have been predicted by the person skilled in the art. The subject matter of **Claims 3-6** does not, therefore, involve an inventive step as defined by PCT Article 33(3).

Concerning the subject matter of **Claim 8**, i.e. the transmembrane and cytoplasmic domain of the env protein of HERV-W, it should be noted that, although its involvement in the fusogenic role of the env is novel, this subject matter is not considered inventive, as the domains of the said protein involved in the fusogenic power are determined by technical steps which are standard practice to a person skilled in the art, especially given that the position of the luminal, transmembrane and cytoplasmic domains of the said protein is disclosed in the prior art (cf. documents D3 and D4).

5. The subject matter of the **use and the method Claims 14, 15, 21, 22, 30 and 35** complies with the requirement of novelty defined by PCT Article 33(2). However, given that the prior art D3 and D4 discloses the fusogenic role of the env protein of the retrovirus HERV-W in the placenta, and that identifying the domains of the said protein involved in the fusogenic capacity does not exceed the normal knowledge and abilities of a person skilled in the art, the IPEA considers that its therapeutic application does not involve an inventive step as defined by PCT Article 33(3).

INTERNATIONAL PCT/FR 00/02429 PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02429

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

Application no	Publication date	Filing date	Priority date (validly claimed)
Patent no	(day/month/year)	(day/month/year)	(day/month/year)
WO99/60020	25.11.1999	17.05.1999	18.05.1998
			20.10.1998

The applicant's attention is drawn to the fact that document WO99/60020 will be considered as prior art in some PCT Contracting States. For example, the EPO will consider that this document prejudices the novelty of the subject matter of this application (PCT Article 54(3) and (4)) to the extent that the same Contracting States are designated (see page 25, lines 7-22, page 28, line 29 to page 29, line 25, Example 1).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. In **Claims 1, 12, 16, 18, 21, 22 and 31** the term 'fragment' is imprecise, as it does not define either the size or the position of the fragment. It therefore encompasses an infinite number of possibilities and extends the scope of protection sought to proteins/genes having no relationship with those of the present application. The said claims do not, therefore, comply with the requirements of PCT Article 6 (lack of clarity, lack of support).
2. Because the length of the sequence with which the successions of 20 amino acids have 80, 90 or 95% identity is not specified, the scope of protection sought in **Claims 1, 2, 5 and 7** is also extended to proteins not having any relationship with the protein of the present application (PCT Article 6, lack of clarity, lack of support).
3. The term 'ligand' (**Claim 35**) is vague and imprecise and leaves in doubt the scope of the protection sought, as it defines the compound by its function and not by its structural features. This type of definition does not refer to a specific compound or group of compounds, but encompasses an infinite number of compounds which can have very different chemical compositions. The subject matter of the said **claim** does not therefore comply with the requirements of PCT Article 6 (lack of clarity, lack of support).
5. The expressions 'at least', 'besides', 'among

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
EP/FR 00/02429

VIII. Certain observations on the international application

others' (**Claims 17-20 and 31**) are vague and imprecise and leave doubt as to the scope of the protection sought (PCT Article 6).

10/069883

JC19 Res. CT/PTO 01 MAR 2002

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of

Francois MALLET, Francois-Loic COSSET, Attn: PCT Branch
Jean-Luc BLOND, Dimitri LAVILLETTE,
Olivier BOUTON, Alessia RUGGIERI

Application No. New U.S. National Stage of PCT/FR00/02429

Filed: March 1, 2002

Docket No.: 112062

For: METHOD FOR DETECTING THE EXPRESSION OF AN ENVELOPE PROTEIN
OF A HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUS AND USES OF A GENE
CODING FOR SAID PROTEIN


**TRANSLATION OF THE ANNEXES TO THE
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

Director of the U.S. Patent and Trademark Office
Washington, D.C. 20231

Sir:

Attached hereto is a translation of the annexes to the International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/409). The attached translated material replaces the claims.

Respectfully submitted,


William P. Berridge
Registration No. 30,024

Joel S. Armstrong
Registration No. 36,430

WPB:JSA/mlb
Date: March 1, 2002

OLIFF & BERRIDGE, PLC
P.O. Box 19928
Alexandria, Virginia 22320
Telephone: (703) 836-6400

DEPOSIT ACCOUNT USE AUTHORIZATION Please grant any extension necessary for entry; Charge any fee due to our Deposit Account No. 15-0461
--

CLAIMS

1. A method for detecting the expression of an envelope protein or polypeptide of a human endogenous retrovirus, characterized in that the protein or polypeptide has a polypeptide sequence which comprises the sequence SEQ ID No. 1 or a fragment of SEQ ID No. 1, or a sequence which exhibits, for any series of 20 amino acids, at least 80%, preferably at least 90%, or even at least 95% identity with the sequence SEQ ID No. 1 or with a fragment of SEQ ID No. 1, and in that the fusogenic power of said protein or of said fragment in cells of a cellular tissue or of a cell culture is detected by demonstrating the formation of syncytia.
2. A method for detecting the expression of an envelope protein or polypeptide of a human endogenous retrovirus, characterized in that the protein or polypeptide has a polypeptide sequence which exhibits, for any series of 20 amino acids, at least 80%, preferably at least 90%, or even at least 95% identity with the sequence SEQ ID No. 1, and in that the fusogenic power of said protein in cells of a cellular tissue or of a cell culture is detected by demonstrating the formation of syncytia.
3. The method as claimed in claim 1 or 2, characterized in that the protein is encoded by the env gene of the HERV-W endogenous retrovirus.
4. The method as claimed in claim 3, characterized in that the protein is encoded by an open reading frame located on chromosome 7 of the human genome.
5. The method as claimed in claim 4, characterized in that the protein has a polypeptide sequence which exhibits, for any series of 20 amino acids, at least

Replaced
by article 34
Amendment

80%, preferably at least 90%, or even at least 95% identity with the sequence SEQ ID No. 1.

6. The method as claimed in claim 5, characterized in that the protein has a polypeptide sequence which consists of SEQ ID No. 1.

7. The method as claimed in claim 1, characterized in that the polypeptide has a polypeptide sequence which begins at amino acid 448 and ends at amino acid 538 of SEQ ID No. 1.

8. The method as claimed in claim 7, characterized in that the polypeptide has a polypeptide sequence which exhibits, for any series of 20 amino acids, at least 80%, preferably at least 90%, or even at least 95% identity with the polypeptide sequence which begins at amino acid 448 and ends at amino acid 538 of SEQ ID No. 1.

9. The method as claimed in claim 7 or 8, characterized in that the polypeptide has a polypeptide sequence which consists of the polypeptide sequence which begins at amino acid 448 and ends at amino acid 538 of SEQ ID No. 1.

10. The method as claimed in any one of the preceding claims, characterized in that the cells of said tissue or of said cell culture are chosen from bone cells, muscle cells, placenta cells, endothelial cells, in particular of blood vessels, epithelial cells, glial cells and tumor cells or cells derived from tumor cell lines.

11. The method as claimed in any one of the preceding claims, characterized in that the detection of the fusogenic power of said protein consists in:

obtaining a vector for expression of said protein, based on which the expression of the protein or of its gene is under the control of a promoter, preferably a strong promoter,

- 5 transfecting cells with the vector obtained, so as to obtain producer cells expressing, at their surface, said protein, and observing the formation of syncytia or the absence of formation of syncytia.

10

12. The method as claimed in any one of the preceding claims, characterized in that the detection of the fusogenic power of the protein consists in:

- 15 obtaining a vector for expression of said protein, based on which the expression of the protein or of its gene is under the control of a promoter, preferably a strong promoter,

- 20 transfecting cells with the vector obtained, so as to obtain producer cells expressing, at their surface, said protein,

- 25 coculturing naïve indicator cells, expressing, at their surface, a receptor for said protein, in the presence of said producer cells, and observing the formation of syncytia or the absence of formation of syncytia.

- 30 13. The use of a gene or of a nucleic acid, or of a fragment of gene or of a nucleic acid, coding for a protein or a polypeptide as defined in any one of claims 1, 6 or 9, under suitable conditions which allow its expression, for preparing a therapeutic or prophylactic composition.

- 35 14. The use as claimed in claim 13, characterized in that said composition is intended for the treatment of cancers.

15. The use as claimed in claim 13, characterized in that said composition is intended to prevent a deficiency in placental development or to prevent a deficiency in the natural formation of any other type of syncytia, said deficiency being associated with a pathology.

16. The use as claimed in claim 13, 14 or 15, characterized in that the composition is intended for treatment by gene therapy.

17. A therapeutic or prophylactic composition comprising a gene or a nucleic acid, or a fragment of gene or of nucleic acid, coding for a protein or a polypeptide as defined in any one of claims 1 to 9.

18. The composition as claimed in claim 17, characterized in that it also comprises a heterologous or autologous promoter, preferably a heterologous promoter, for the expression of said protein or of said polypeptide.

19. An expression vector comprising at least one gene or one nucleic acid, or one fragment of gene or of nucleic acid, coding for a protein or a polypeptide as defined in any one of claims 1 to 9, and elements required for its expression in a host cell.

20. A host cell comprising at least one vector as claimed in claim 19.

21. A therapeutic or prophylactic composition comprising at least one expression vector as claimed in claim 19.

22. The use of a composition as claimed in any one of claims 17, 18 and 19, for producing a medicament

intended for the treatment of cancers by destroying cancer cells by means of the formation of syncytia.

5 23. The use of a composition as claimed in any one of claims 17, 18 and 19, for producing a medicament intended to prevent a deficiency in placental development or to prevent a deficiency in the natural formation of any other type of syncytia, said deficiency being associated with a pathology.

10

24. The use of a protein or of a polypeptide as defined in any one of claims 1 to 9, in a gene therapy vector, said gene therapy vector comprising, inter alia, a protein or a polypeptide as defined in any one of claims 1 to 9.

15

25. A gene therapy vector comprising a protein or a polypeptide as defined in any one of claims 1 to 9.

20 26. A vector as claimed in claim 25, chosen from a retroviral vector of the MLV type, a lentiviral vector pseudotyped with a protein or a polypeptide as defined in any one of claims 1 to 9, and a synthetic vector.

25 27. A therapeutic composition comprising, inter alia, a therapy vector as defined in either of claims 25 and 26, and an antisense nucleic acid sequence or oligonucleotide.

30 28. A therapeutic composition comprising, inter alia, a therapy vector as defined in either of claims 25 and 26, and a gene of therapeutic interest.

35 29. A cell expressing a protein or a polypeptide as defined in any one of claims 1 to 9.

30. The use of a cell as claimed in claim 29, as a cellular vector.

31. A therapeutic composition comprising, inter alia, a cell or a cellular vector as defined in claims 29 and 30.

5 32. A method for selecting medicinal substances or drugs, or gene/prodrug systems, capable of having a qualitative and/or quantitative effect on the fusogenic power of a protein or of a polypeptide as defined in
10 medicinal substance or drug, or said gene/prodrug system, is brought into contact with cells of a cell culture expressing said protein or said polypeptide, and a regression or a disappearance of the formation of syncytia is observed.

15 33. A therapeutic composition comprising, inter alia, an antisense nucleic acid sequence or oligonucleotide capable of hybridizing to a gene or a fragment of gene, or to a nucleic acid or fragment of nucleic acid,
20 coding for a protein or a polypeptide as defined in any one of claims 1 to 9.

34. A therapeutic composition comprising, inter alia, a ligand capable of recognizing and binding to the
25 receptor for the protein defined in SEQ ID No. 1.

35. The therapeutic composition as claimed in claim 34, comprising at least one ligand chosen from a monoclonal antibody, a polyclonal antibody, a
30 transmembrane antibody or a fragment of said antibodies, and an inhibitory molecule, said ligand being specific for the receptor of the protein defined in SEQ ID No. 1.

35 36. A therapeutic composition comprising, inter alia, a gene of therapeutic interest, said gene coding for a ligand as defined in claim 35 and being placed under

the control of the elements required to ensure its expression *in vivo*.

37. A gene therapy vector comprising, at its surface,
5 the receptor for the protein identified in SEQ ID
No. 1, in particular to target cells producing the
protein identified in SEQ ID No. 1 in a constitutive or
induced manner.

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) B05B3454WO

Box No. I TITLE OF INVENTION

METHOD FOR DETECTING THE EXPRESSION OF AN ENVELOPE PROTEIN OF A HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUS AND USES OF A GENE CODING FOR SAID PROTEIN

Box No. II APPLICANT

☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

BIO MERIEUX
Chemin de l'Orme

F-MARCY L'ETOILE 69280
France

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant
for the purposes of:

☐all designated
States☒all designated States except the
United States of America☐the United States
of America only☐the States indicated in the
Supplemental Box**Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
101 Rue de Tolbiac
F-75654 PARIS CEDEX 13
France

This person is:

☒

applicant only

☐

applicant and inventor

☐inventor only (If this check-box is
marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for
the purposes of:

☐all designated
States☒all designated States except
the United States of America☐the United States
of America only☐the States indicated in the
Supplemental Box☒

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒

agent

☐

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

CABINET GERMAIN & MAUREAU
BP 6153
F-69466 LYON CEDEX 06
France

Telephone No.

04 72 69 84 30

Facsimile No.

04 72 69 84 31

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐

Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Francois MALLET
84 Rue Anatole France
F-69100 VILLEURBANNE
France

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

COSSET, Francois-Loic
30 Grande Rue de la Guillotiere
F-69007 LYON
France

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Jean-Luc BLOND
75 Bis rue des Aqueducs
F-69005 LYON
France

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Dimitri LAVILLETTE
8 Rue de Bourtibourg
F-10290 BERCENAY LE HAYER
France

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION OF STATES

Mark the applicable check-boxes below, at least one must be marked.

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a): **(Double-click here if you want all the boxes below checked.)****Regional Patent**

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)*.....

National Patent *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):*

- | | | |
|--|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda | <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> MZ Mozambique |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| | <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize | Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH & LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CO Colombia | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania | |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg | <input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algeria | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America .. |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | Republic of Macedonia | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa |
| | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. *(Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)*

Supplemental Box

If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.

1. If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No...." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:

BOUTON, Olivier
48 Avenue du Chater
F-69340 FRANCHEVILLE
France
France

(i) if more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;

RUGGIERI, Alessia
27 Rue du Puits
F-68100 MULHOUSE
France
France

(ii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;

(iii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;

(iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;

(v) if, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;

(vi) if, in Box No. VI, there are more than five earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.

2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: * regional Office	international application: receiving Office
item (1) 01/09/1999 1 September 1999	99 11141	France		
item (2) 15/09/1999 15 September 1999	99 11793	France		
item (3)				
item (4)				
item (5)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☐ all items
 ☒ item (1)
 ☒ item (2)
 ☐ item (3)
 ☐ item (4)
 ☐ item (5)
 ☐ other, see Supplemental Box

**Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):*

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA /EP

Request to use results of earlier search: reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)	Number	Country (or regional Office) EP
-----------------------	--------	------------------------------------

Box No. VIII DECLARATIONS

The following **declarations** are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

Number of
declarations

- | | | |
|--------------------------|--------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | Box No. VIII (i) | Declaration as to the identify of the inventor |
| <input type="checkbox"/> | Box No. VIII (ii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent |
| <input type="checkbox"/> | Box No. VIII (iii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application |
| <input type="checkbox"/> | Box No. VIII (iv) | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) |
| <input type="checkbox"/> | Box No. VIII (v) | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty: |

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE FILING

This international application contains:

(a) the following number of sheets in paper form:

request (including declaration sheets)

5

description (excluding sequence listing part) :

27

claims : 5

abstract : 1

drawings : 6

Sub-total number of sheets : 44

sequence listing part of description

(actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below) : 5

Total number of sheets : 49

(b) sequence listing part of description filed in computer readable form

(i) ☐ only (under Section 801(a)(i))(ii) ☐ in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(ii))**Type and number of carriers** (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which the sequence listing part is contained (additional copies to be indicated under item 9(ii), in right column):

This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):

Number of items

1. ☒ fee calculation sheet :
2. ☐ original separate power of attorney :
3. ☐ original general power of attorney :
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: :
5. ☐ statement explaining lack of signature :
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): :
7. ☐ translation of international application into (language): :
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :
9. ☒ sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other))
- (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) :
- (ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (b)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter :
- (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column :
10. ☒ other (specify) PCT Easy disk

Figure of the drawings which should accompany the abstract:**Language of filing** of the international application: French**Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE**

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

CABINET GERMAIN & MAUREAU
Dominique GUERRE

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /EP	
6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau:

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau

WIPO

(43) International publication date

8 March 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) International publication number

WO 01/16171 A1

(51) International patent classification⁷:

C07K 14/15, C12N 15/48, A61P 35/00,
15/00, A61K 39/21, 48/00, C12N 5/10

(21) International application number:

PCT/FR00/02429

(22) International filing date:

1 September 2000 (01.09.2000)

(25) Language of filing:

French

(26) Language of publication:

French

(30) Data relating to the priority:

99/11,141 1 September 1999 (01.09.1999) FR
99/11,793 15 September 1999 (15.09.1999) FR

(71) Applicant (for all designated States except US):

BIOMERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280
Marcy l'Etoile (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE
[FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13
(FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (US only): MALLET, François
[FR/FR]; 84, rue Anatole France, F-69100 Villeurbanne

[continued on next page]

As printed

(54) Title: METHOD FOR DETECTING THE EXPRESSION OF AN ENVELOPE PROTEIN OF A HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUS AND USES OF A GENE CODING FOR SAID PROTEIN

(54) Titre: PROCÉDE DE DETECTION DE L'EXPRESSION D'UNE PROTEINE D'ENVELOPPE D'UN RETROVIRUS ENDOGENE HUMAIN ET UTILISATIONS D'UN GENE CODANT POUR CETTE PROTEINE

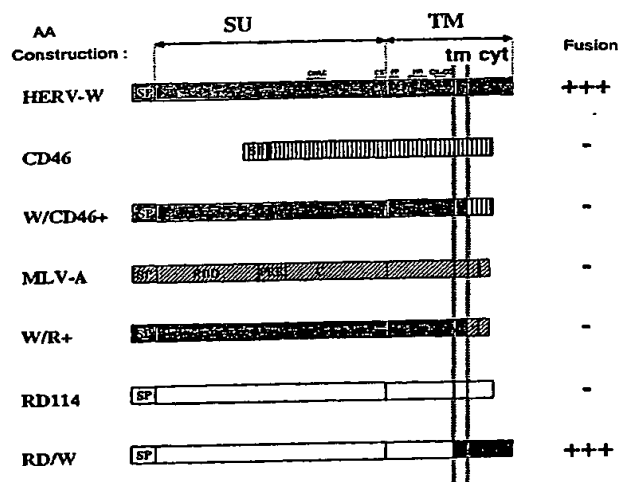


Figure XXX. Schéma et caractérisation des Env HERV-W chimères.
DIAGRAM AND CHARACTERISATION OF CHIMERIC Env HERV-W

SP...SIGNAL SEQUENCE
RBD...RECEPTOR BINDING DOMAIN
PRR...PROTEIN-RICH REGION
C...CARBOXY-TERMINAL
TM...TRANSMEMBRANE SUBMIT
SU...SURFACE SUBMIT
tm...TRANSMEMBRANE ANCHORING DOMAIN
cyt...CYTOPLASMIC PART
AA...CONSTRUCT

(57) Abstract: The invention concerns a method for detecting the expression of an envelope protein or polypeptide of a human endogenous retrovirus, characterised in that the protein or polypeptide has a polypeptide sequence comprising the sequence SEQ ID NO: 1 or a fragment of SEQ ID NO: 1 or a sequence having, for every sequence of 20 amino acids, at least 90 % identity with the SEQ ID NO: 1 or with a fragment of SEQ ID NO: 1, and the method consists in detecting the fusogenic power of said protein or said fragment in the cells of a cell tissue or cell culture, by demonstrating the formation of syncytia. A gene or a nucleic acid or a fragment thereof is used for preparing a therapeutic or prophylactic composition, in particular for treating cancers and for preventing deficiency in placental development.

(57) Abrégé: Le procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, est caractérisé en ce que la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO: 1 ou un fragment de SEQ ID NO: 1 ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 90% d'identité avec la séquence SEQ ID NO: 1 ou avec un fragment de SEQ ID NO: 1, et en ce qu'on détecte le pouvoir

[continued on next page]

(FR). COSSET, François-Loïc [FR/FR]; 30, Grande rue de la Guillotière, F-69007 Lyon (FR). BLOND, Jean-Luc [FR/FR]; 75, bis rue des Aqueducs, F-69005 Lyon (FR). LAVILLETTE, Dimitri [FR/FR]; 8, rue de Bourtibourg, F-10290 Bercenay Le hayer (FR). BOUTON, Oliver [FR/FR]; 48, avenue du Chater, F-69340 Francheville (FR). RUGGIERI, Alessia [FR/FR]; 27, rue du Puits, F-68100 Mulhouse (FR).

(74) **Representative:** CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(81) **Designated states (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Designated states (regional):** ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- *With the International Search Report.*
- *Before expiry of the period provided for amending the claims, will be republished if such amendments are received.*

For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.

fusogène de ladite protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture cellulaire, par la mise en évidence de la formation de syncytia. On utilise un gène ou un acide nucléique ou un fragment de ceux-ci pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique, notamment pour traiter des cancers et prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta.

**PROCÉDE DE DETECTION DE L'EXPRESSION D'UNE PROTEINE
D'ENVELOPPE D'UN RETROVIRUS ENDOGENE HUMAIN ET UTILISATIONS
D'UN GENE CODANT POUR CETTE PROTEINE**

5 Les rétrovirus sont des virus enveloppés qui portent des spicules glycoprotéiques codées par les virus à leur surface. Ces glycoprotéines d'enveloppe sont synthétisées sous la forme de précurseurs polyprotéiques (Pré-env) qui sont ensuite clivés par des protéases cellulaires en protéine de surface mature (SU) et en protéine transmembranaire (TM). Les glycoprotéines d'enveloppe sont impliquées dans
10 l'entrée des virus dans les cellules hôte. Elles reconnaissent spécifiquement et se lient à des récepteurs de surface cellulaire et sont nécessaires pour la fusion de l'enveloppe virale et des membranes cellulaires de l'hôte. Le récepteur et l'enveloppe sont des molécules multamériques ou oligomériques. Pour tous les virus enveloppés, les interactions des glycoprotéines d'enveloppe avec le ou les récepteur(s) cellulaire(s)
15 conduisent à des réarrangements conformationnels de l'enveloppe nécessaires à l'exposition du peptide de fusion. La fusion a lieu à la surface de la cellule ou dans des vésicules cellulaires suivant la voie d'endocytose du virion. De plus, pour permettre l'entrée du virus, une fusion médiée par les protéines de surface virales peut, dans certaines conditions, provoquer une fusion cellule à cellule avec pour résultat la
20 formation de cellules multinucléées géantes ou syncytia. La formation de syncytia est réalisée par au moins deux voies : un virion peut simultanément fusionner avec deux cellules, on parle alors de fusion " from without ", ou une cellule infectée qui exprime les glycoprotéines d'enveloppe à sa surface peut fusionner avec une cellule adjacente (fusion " from within ").

25 Les déterminants de l'enveloppe et la séquence des événements causant les changements conformationnels de l'enveloppe lors des processus de fusion " from without " sont bien documentés pour les orthomyxovirus qui nécessitent un environnement acide des vésicules d'endocytose pour leur entrée (Skehel, J. J. et al., PNAS, 79 :968-972 (1982)). Pour les rétrovirus, pour lesquels la voie d'entrée est
30 indépendante du pH, les déterminants précis et les étapes, menant de la reconnaissance du récepteur à l'activation de la fusion ne sont pas encore élucidés. D'autres rétrovirus sont connus pour induire une fusion cellule à cellule (" fusion from within "), tels que

~~le virus de la leucémie féline, le virus de la tumeur mammaire de la souris, le virus de la réticuloendothéliose aviaire, VIH et SIV.~~

Par ailleurs, Fefferey S. Jones et Rex Risser (Journal of Virology, Janv. 1993, p 67-74) ont montré que les glycoprotéines d'enveloppe du virus de la leucémie murine écotrope (MuLV) de type sauvage, sous la dépendance du LTR viral, étaient capables d'induire la formation de syncytia dans des cellules de rat XC en l'absence de virion (fusion " from within ").

De la connaissance des inventeurs, il n'a jamais été montré de pouvoir fusogène, dans un processus de fusion " from within ", des glycoprotéines d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain.

Des auteurs ont bien émis l'hypothèse que l'enveloppe rétrovirale endogène de ERV3, un rétrovirus endogène humain proche de MLV (Moloney Leukemia Virus), pouvait être impliquée *in vivo* dans l'élaboration du placenta via un processus de fusion (Patrick J. W. Venables et al., Virology, 211, 589-592 (1995)) mais ce phénomène n'a jamais été démontré *in vitro*. D'autre part, les études sur le polymorphisme de *env* ERV3, sur des individus d'origine caucasienne, ont permis de mettre en évidence la présence d'une mutation dans la région (SU) de l'enveloppe ERV3 générant un codon stop précoce présent à l'état homozygote dans 1% de la population étudiée, sans que ces individus présentent d'anomalie de la grossesse ou du développement placentaire (Nathalie de Parseval et Thierry Heidmann, Journal of Virology, Vol ; 72, N° 4, pages 3442-3445 (1998)), mettant ainsi en cause l'hypothèse précédemment émise.

Les présents inventeurs ont maintenant mis en évidence *in vitro* que la glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W non modifiée, exprimée sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur hétérologue, possède des propriétés fusogènes.

HERV-W est une famille de rétrovirus endogènes humains multi-copie récemment décrite, dénommée ainsi en raison de l'homologie entre le site de fixation de l'amorce de la transcription inverse et celui des rétrovirus aviaires utilisant l'ARNt Trp. Aucune entité compétente pour sa réplication n'a été mise en évidence. La fonctionnalité d'une région promotrice a été vérifiée et, parmi différents tissus humains sains testés, son expression semble être restreinte au placenta par Northern Blot (J. L.

Blond et al., Journal of Virology, Vol. 73, N° 2, pages 1175-1185 (1999)). Un cadre ouvert de lecture unique codant pour une enveloppe rétrovirale potentiellement fonctionnelle existe sur le chromosome 7. Un clone ADNc correspondant vraisemblablement à un transcrit sous génomique et portant la séquence de l'enveloppe complète a été isolé à partir de matériel placentaire (clone cl.PH74, GenBank AF072506, dont la séquence est identifiée par SEQ ID NO :2). Les études phylogénétiques effectuées au niveau protéique indiquent que la protéine d'enveloppe est de type D. La séquence SEQ ID NO :2 donnée en fin de description correspond donc à la séquence nucléotidique en ADNc complète du clone cl.PH74 dont la séquence protéique est identifiée par SEQ ID NO :1.

Env HERV-W possède tous les "attributs" d'une enveloppe rétrovirale : en particulier, un peptide leader, les deux sous unités caractéristiques SU et TM séparées par un site de clivage par les furines et, au niveau de sa TM, elle possède un peptide de fusion hydrophobe, une région immunosuppressive et une région carboxyl transmembranaire suivie d'une queue cytoplasmique longue. L'expression de Env HERV-W a été mise en évidence dans le placenta.

Les expériences réalisées par les inventeurs montrent que Env HERV-W entraîne, par fusion de cellule à cellule, la formation de syncytia dans différentes lignées cellulaires testées d'origine humaine et simienne. Le phénomène de fusion observé est dépendant de la reconnaissance de récepteur(s) spécifique(s), comme montré de manière directe lors de transfections et de manière indirecte lors de co-cultures des cellules transfectées avec d'autres types cellulaires. Les présents inventeurs ont par ailleurs identifié le récepteur spécifique de Env HERV-W par une approche de compétition s'appuyant sur la propriété d'interférence des enveloppes rétrovirales, en bloquant des récepteurs cellulaires par une protéine d'enveloppe autre que Env HERV-W, empêchant ainsi la formation de syncytia. Le récepteur identifié par les présents inventeurs est le récepteur hATB^o des rétrovirus mammifères de type D exprimé dans les cellules humaines (Rasko E. J. et al. PNAS, 1999, 96 : 2129-2134 et Tailor C. S. et al. J. Virol., 1999, 73(5) : 4470-4474). L'utilisation de ce récepteur, dont le procédé de mise en évidence est décrit dans un des exemples, fait également partie de la présente invention.

Aussi la présente invention a pour objet un procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, selon lequel la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO:1 ou un fragment de SEQ ID NO:1, ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80 %, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO:1, et selon lequel on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture cellulaire, par la mise en évidence de la formation de syncytia.

Un autre objet de l'invention est un procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, selon lequel la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80 %, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1, et selon lequel on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine dans des cellules d'un tissu cellulaire, ou d'une culture cellulaire par la mise en évidence de la formation de syncytia.

Selon l'invention, ladite protéine ou ledit polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO:1 ou un fragment de SEQ ID NO:1, ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95%, d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO:1.

Il est bien entendu selon la présente invention, que ladite protéine ou ledit polypeptide, ou leurs dits fragments, s'ils ne présentent pas une identité complète avec SEQ ID NO:1 ou ses fragments, doivent posséder un pouvoir fusogène, de préférence au moins égal ou supérieur à celui de SEQ ID NO:1 ou ses fragments.

Si les fragments de la protéine ou du polypeptide de l'invention présentent une identité complète avec les fragments de SEQ ID NO:1, alors la taille de ces fragments peut être inférieure à 20 acides aminés, par exemple elle peut être d'environ 10 acides aminés, voire d'environ 5 acides aminés.

Les variations prévues selon l'invention dans la séquence polypeptidique de la protéine ou du polypeptide ou de leurs fragments comprennent les variations liées

au polymorphisme, mais aussi les modifications telles que substitution(s), délétion(s) et addition(s) susceptibles d'être apportées à ladite séquence polypeptidique pour obtenir une protéine, un polypeptide ou un fragment de ceux-ci possédant un pouvoir fusogène, en particulier au moins égal ou supérieur à celui de SEQ ID NO :1 ou ses fragments.

5 L'analyse du polymorphisme peut être réalisée par la méthode SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), qui est une méthode électrophorétique permettant d'objectiver, à l'aide de différences de migration, la présence d'au moins une mutation discriminant deux séquences courtes (inférieures à 250 pb). Ainsi, comme illustré à la figure 4, après amplification sur ADN total à l'aide des amorces U6198 et
10 L6186 ou U 6189 et L6186, il est possible d'analyser le polymorphisme de l'enveloppe localisée sur le chromosome 7 à l'aide du jeu d'amorces représenté (U6302 à L6321), permettant de générer un ensemble de 10 fragments chevauchants de taille adéquate. Le polymorphisme de l'un des sous-fragments peut également être mis en évidence par des techniques de séquençage, de cartographie de restriction le cas échéant, ou plus
15 simplement par une technique d'hybridation sandwich de type ELOSA permettant de discriminer jusqu'à une mutation ponctuelle (Cros P. et al., demande de brevet européen EP 0 486 661).

Des exemples de séquences Env HERV-W polymorphes sont représentées à la figure 1 annexée, les séquences ADN correspondantes étant représentées à la figure
20 2. Ces figures représentent l'alignement de séquences protéiques et nucléiques obtenues par séquençage de clones issus de trois individus différents.

Par ailleurs, le polymorphisme du LTR qui dirige la transcription du gène *env* situé sur le chromosome 7 a été étudié. On observe deux groupes de LTRs 5' dont les séquences nucléiques obtenues par séquençage de deux clones provenant de deux
25 individus différents sont représentées et alignées dans la figure 3.

Un choix judicieux d'amorces a permis d'amplifier spécifiquement sur le chromosome 7, à partir d'ADN humain total, un fragment nucléique contenant l'intégralité de l'information U3RU5-gag-pol-env-U3RU5 à l'aide des amorces U6198, L6186 ou exclusivement la séquence env-U3RU5 à l'aide des amorces U6189, L6186.
30 Une telle approche est par exemple possible en utilisant une amorce chevauchant la zone de jonction entre la séquence rétrovirale (U3 en amont, U5 en aval) et la séquence flanquante non rétrovirale contiguë. Par, exemple, l'amorce L6186 chevauche la région

US 3' terminale et la séquence non rétrovirale avale. A partir d'un tel produit de PCR isolant la séquence d'intérêt du mélange des séquences HERV-W présentes dans le génome humain, il est possible de réaliser une analyse du polymorphisme.

De manière préférentielle, ladite protéine présente au moins l'une des

5 caractéristiques suivantes :

- elle est codée par le gène *env* du rétrovirus endogène HERV-W ;
 - elle est codée par un cadre de lecture ouvert situé sur le chromosome 7 du génome humain ;
 - elle présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence
- 10 SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la SEQ ID NO :1. De préférence, elle consiste en SEQ ID NO:1.

De manière préférentielle, le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de

15 SEQ ID NO : 1 ou une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO:1. De préférence, il consiste en une

20 séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO:1. Le polypeptide qui répond à la définition ci-dessus est un élément de régulation pouvant conférer ou restituer sa capacité fusogénique à une enveloppe rétrovirale non réputée fusogène dans un test de fusion cellule-cellule.

Les cellules dudit tissu ou de ladite culture cellulaire dans lesquelles on recherche à mettre en évidence le pouvoir fusogène sont avantageusement choisies

25 parmi les cellules osseuses, les cellules musculaires, les cellules placentaires, les cellules endothéliales, en particulier des vaisseaux sanguins, les cellules épithéliales, les cellules gliales et les cellules tumorales ou issues de lignées cellulaires tumorales.

Comme cela sera illustré dans les exemples qui suivent, la détection du pouvoir fusogène de ladite protéine ou dudit polypeptide peut être mise en œuvre selon

30 au moins l'un quelconque des deux protocoles suivants.

Selon un premier protocole, on obtient un vecteur d'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide à partir duquel l'expression de la protéine, du

polypeptide ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort ; on transfecte des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine ou ledit polypeptide; et on observe la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

5 Selon un second protocole, on obtient un vecteur d'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide à partir duquel l'expression de la protéine, du polypeptide ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort; on transfecte des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine ou ledit polypeptide; on
10 co-cultive des cellules naïves indicatrices exprimant à leur surface un récepteur de ladite protéine en présence desdites cellules productrices ; et on observe la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

La présente invention concerne en outre l'utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une
15 protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment dans la description des procédés objets de l'invention, dans des conditions appropriées permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique.

Un autre objet de l'invention est une composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou
20 d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment.

Une telle composition peut comprendre en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

25 L'invention concerne aussi les objets suivants :

- un vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ;

30 - une cellule hôte comprenant au moins un vecteur d'expression de l'invention, et

~~une composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression ou une cellule hôte de l'invention.~~

Les différentes compositions thérapeutiques de l'invention sont en particulier destinées au traitement de cancers, tel que par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia. Les différentes compositions prophylactiques de l'invention sont notamment destinées à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta.

Les compositions de l'invention thérapeutiques ou prophylactiques, telles que définies ci-dessus, sont avantageusement destinées à un traitement communément dénommé « traitement par thérapie génique » ou « traitement par transfert de gène ».

Comme énoncé ci-dessus, les propriétés fusogènes de la protéine Env HERV-W, du polypeptide Env HERV-W ou de leurs fragments tels que définis dans la présente invention trouvent notamment une application dans le domaine de la thérapie génique des cancers.

A ce jour les gènes les plus fréquemment utilisés dans la thérapie contre les cancers sont (i) les gènes qui codent pour des protéines qui augmentent l'immunogénicité des cellules tumorales, telles que les cytokines pro-inflammatoires, (ii) les gènes qui codent pour des enzymes qui rendent les cellules cancéreuses sensibles à un pro-médicament dans des systèmes gène/pro-drogue, tels que le système thymidine kinase du virus Herpes Simplex/Ganciclovir ou le système cytosine désaminase/5FC.

De manière idéale, le transfert de gènes thérapeutiques devrait conduire à la fois à une destruction locale des cellules cancéreuses, à l'activation de l'immunité anti-tumorale pour éliminer les zones tumorales auxquelles les gènes thérapeutiques ne peuvent être délivrés et le traitement ne devrait pas causer de dommages aux tissus cellulaires normaux de l'hôte, en particulier aux tissus des organes vitaux.

La protéine ou le polypeptide de l'invention qui comprend ou consiste en la protéine Env HERV-W ou ses fragments, en particulier un fragment qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO : 1, ou en une séquence polypeptidique présentant pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO : 1 ou un fragment de SEQ ID NO : 1 et en particulier le fragment identifié ci-dessus, sous la dépendance d'un promoteur hétérologue ou autologue capable

d'induire son expression répond aux critères définis ci dessus via la formation de syncytia. Ces syncytia se forment à partir de cellule(s) transfectée(s) par un processus de fusion de cellule à cellule.

Dans un mode de réalisation en vu d'optimiser ses caractéristiques thérapeutiques, la protéine ou le polypeptide de l'invention ou tout fragment est éventuellement fusionné avec d'autres protéine(s) ou fragment(s) de protéine(s), même si intrinsèquement il répond aux critères définis précédemment. A contrario, tout ou partie de la protéine, et en particulier le polypeptide dont la séquence peptidique comprend ou consiste en la séquence qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO : 1, peut être fusionné à d'autres protéines en vue de leur conférer des propriétés particulières. La protéine ou le polypeptide de l'invention ou son fragment est capable d'induire la formation de syncytia à un pH voisin de la neutralité ou à pH neutre. Typiquement le vecteur d'expression ou plasmide sera adapté pour permettre l'expression de la protéine, du polypeptide ou fragment induisant la formation de syncytia, de telle sorte que lorsqu'il est exprimé la protéine, le polypeptide ou fragment puisse induire la fusion des cellules transfectées avec d'autres cellules humaines non transfectées. Il est souhaitable que la protéine ou le polypeptide de l'invention soit exprimé indépendamment d'autres composants viraux, à moins que ceux ci soient utiles à la vectorisation.

Aussi, la présente invention a pour objet un gène ou un acide nucléique, ou un fragment de gène ou d'un acide nucléique, recombinant codant pour une protéine ou un polypeptide ou un fragment de l'invention qui induit la formation de syncytia par fusion de cellules transformées et de cellules malignes cibles et son utilisation dans le domaine de la thérapie de maladies malignes, telles que les cancers.

L'invention concerne également une méthode de traitement d'une maladie maligne chez un patient qui consiste à administrer au patient le gène ou un acide nucléique, ou un fragment de gène ou d'un acide nucléique, recombinant codant pour une protéine ou un polypeptide ou un fragment de l'invention qui induit la formation de syncytia par fusion de cellules transformées et de cellules malignes cibles.

Le gène ou l'acide nucléique, ou le fragment de gène ou d'acide nucléique est introduit *in vitro* dans des cellules humaines appropriées, telles que des cellules de lignées continues immortalisées, par des techniques standards connues de l'homme du

~~métier, telle que transfection, transduction ou transformation, et les cellules ainsi~~
~~transformées sont ensuite introduites chez le patient où elles peuvent exercer leur~~
propriétés fusogènes.

Le gène ou l'acide nucléique, ou le fragment de gène ou d'acide nucléique
5 de l'invention peut être utilisé de différentes manières pour le traitement de cancers, en
particulier pour le traitement de tumeurs solides ou molles. Les cellules cibles peuvent
être transformées *ex vivo* ou *in vivo* par les vecteurs (plasmides) codant pour le
polypeptide de l'invention.

Les propriétés fusogènes de la protéine Env HERV-W, du polypeptide
10 Env HERV-W ou de leurs fragments tels que définis dans la présente invention
trouvent également une application dans le domaine de la prophylaxie pour prévenir
une déficience dans l'élaboration du placenta et pallier des échecs de grossesse.

Le gène ou l'acide nucléique ou leurs fragments tels que définis dans
l'invention peuvent donc être utilisé pour différents effets thérapeutiques ou
15 prophylactiques, le but ultime étant soit (i) de détruire les cellules cibles par formation
de syncytia induisant une mort cellulaire des cellules cibles par un processus de mort
différent de la mort cellulaire par apoptose, soit (ii) d'induire ou de favoriser la
formation de syncytia, par exemple pour pallier une déficience dans la formation des
syncytiotrophoblastes lors de la grossesse, ou pour prévenir une déficience dans la
20 formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une
pathologie.

L'invention concerne également l'utilisation de la protéine Env HERV-W
ou d'un fragment de Env HERV-W, tels que définis précédemment, à la surface d'un
vecteur de thérapie génique comprenant, entre autres, un gène ou une séquence d'acide
25 nucléique ou un oligonucléotide d'intérêt thérapeutique susceptible d'être exprimé dans
une cellule cible ou de s'hybrider à une séquence nucléotidique complémentaire d'une
cellule cible, ladite protéine Env HERV-W ou ledit fragment de cette protéine
interagissant avec son récepteur cellulaire décrit ci-dessus, favorisant ainsi
l'introduction du gène ou de la séquence d'acide nucléique ou de l'oligonucléotide
30 d'intérêt thérapeutique dans la cellule cible.

Aussi, l'invention concerne un vecteur de thérapie génique comprenant
une protéine ou un polypeptide ou un fragment d'enveloppe d'un rétrovirus endogène

humain, ladite protéine ou ledit polypeptide présentant une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de SEQ ID NO : 1, en particulier un fragment dont la séquence peptidique comprend ou consiste en la séquence qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO : 1, ou une séquence présentant pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou avec un fragment de SEQ ID NO : 1, en particulier tel que défini ci-dessus. De préférence, le vecteur de thérapie génique de l'invention comprend la séquence SEQ ID NO : 1. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention le vecteur de thérapie génique précédemment cité consiste en un vecteur rétroviral classique de type MLV ou en un vecteur lentiviral pseudotypés par tout ou partie de la protéine d'enveloppe de HERV-W telle que définie ci-dessus, ou encore en un vecteur synthétique portant à sa surface tout ou partie de la protéine Env HERV-W telle que définie ci-dessus conférant les propriétés de ciblage cellulaire et de fusion de la membrane plasmatique.

L'invention concerne encore un vecteur de thérapie génique comprenant à sa surface le récepteur de la protéine identifiée en SEQ ID NO : 1, notamment pour cibler des cellules produisant la protéine identifiée en SEQ ID NO : 1 de façon constitutive ou induite.

Les séquences d'acides nucléiques et/ou oligonucléotides d'intérêt thérapeutique (anti-sens ou codant pour une protéine) permettent notamment de cibler les cellules dans lesquelles un gène est exprimé.

Les séquences d'acides nucléiques ou les oligonucléotides anti-sens sont capables d'interférer spécifiquement avec la synthèse d'une protéine cible, par inhibition de la formation et/ou du fonctionnement du polysome, selon le positionnement de l'anti-sens dans l'ARNm de la cible. Donc, le choix fréquent de la séquence entourant le codon d'initiation de la traduction comme cible pour une inhibition par une séquence d'acide nucléique anti-sens ou par un oligonucléotide anti-sens vise à prévenir la formation du complexe d'initiation. D'autres mécanismes dans l'inhibition par des oligonucléotides anti-sens impliquent une activation de la ribonucléase H qui digère les hybrides oligonucléotide anti-sens/ARNm ou une interférence au niveau de sites d'épissage par des oligonucléotides anti-sens dont la

~~cible est un site d'épissage de l'ARNm. Les oligonucléotides anti-sens sont également complémentaires de séquences ADN et peuvent donc interférer au niveau de la~~
transcription par la formation d'une triple hélice, l'oligonucléotide anti-sens s'appariant par des liaisons hydrogène dites de Hoogsteen au niveau du grand sillon de la double
5 hélice d'ADN. Dans ce cas particulier, on parle plus précisément d'oligonucléotides antigènes. Il est bien entendu que les séquences d'acides nucléiques ou oligonucléotides anti-sens peuvent être strictement complémentaires de la cible ADN ou ARN à laquelle ils doivent s'hybrider, mais aussi non strictement complémentaires à la condition qu'ils s'hybrident à la cible. De même, il peut s'agir d'oligonucléotides
10 anti-sens non modifiés ou modifiés au niveau des liaisons inter-nucléotidiques. Toutes ces notions font partie des connaissances générales de l'homme de l'art.

La présente invention concerne donc une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de thérapie génique, la protéine Env HERV-W ou un fragment de cette protéine telle que définie précédemment, et une séquence d'acide
15 nucléique ou oligonucléotide anti-sens tels que définis ci-dessus.

La protéine Env HERV-W ou un de ses fragments est également utilisé comme vecteur thérapeutique pour le transfert d'un gène d'intérêt thérapeutique dans une cellule cible et dans la formulation d'une composition thérapeutique comprenant au moins un vecteur de thérapie génique, la protéine Env HERV-W ou un fragment de
20 cette protéine telle que définie précédemment, et un gène d'intérêt thérapeutique ainsi que les éléments permettant l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique. Les gènes d'intérêt thérapeutique peuvent être non mutés ou mutés. Ils peuvent également consister en des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide
25 d'agents, tels que la spermine.

Par éléments assurant l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique *in vivo* on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer l'expression dudit gène thérapeutique, après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite
30 cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles d'un polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique.

A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs, tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la vaccine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Dans un autre mode de réalisation, on peut utiliser dans une composition thérapeutique une cellule exprimant la protéine Env HERV-W ou un fragment de cette protéine tels que définis précédemment comme véhicule de gène(s) de grande taille grâce aux propriétés fusogènes de la protéine ou de ses fragments qui permettent la fusion de la cellule vecteur avec une cellule hôte déficiente pour un ou des gènes déterminé(s), permettant ainsi de compenser le ou les gène(s) déficient(s) (exemple : dystrophine).

L'invention concerne donc également une telle cellule et son utilisation comme vecteur cellulaire.

Les propriétés ou pouvoir fusogène(s) de la protéine ou du polypeptide de l'invention ou de leurs fragments sont également utilisées dans un procédé pour tester l'efficacité et sélectionner des drogues ou substances médicamenteuses ou des systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur leur pouvoir fusogène par mise en contact de ladite drogue ou substance médicamenteuse ou dudit système gène/pro-drogue avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide ou ledit fragment et, observation d'une régression ou d'une disparition dans la formation de syncytia, étant entendu que la formation de syncytia à l'état naturel est associée à un état pathologique. A titre d'exemple, on peut citer les phénomènes hémorragiques, la destruction ou l'altération des cellules neuronales, la destruction ou l'altération exacerbée des ostéoblastes.

L'invention concerne aussi un procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses ou de systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide ou d'un fragment tel que défini précédemment. Selon ce procédé, on met en contact ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-

drogue avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide ou ledit fragment et, on observe une régression ou une disparition dans la formation de syncytia.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une séquence d'acide nucléique ou d'au moins un oligonucléotide anti-sens répondant aux critères définis précédemment et susceptible de s'hybrider et d'interférer spécifiquement avec la synthèse de la protéine Env HERV-W et une composition thérapeutique comprenant, entre autres, ladite séquence d'acide nucléique ou oligonucléotide anti-sens dans le but d'obtenir *in vivo* une régression ou une disparition de syncytia associés à un état pathologique.

Dans le but d'obtenir *in vivo* une régression de la formation de syncytia ou une disparition de syncytia associés à un état pathologique, on prépare une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un ligand susceptible de reconnaître le récepteur identifié précédemment et d'inactiver ou inhiber le processus de formation de syncytia ou une composition comprenant un gène codant pour un ligand susceptible de s'exprimer *in vivo* dans une cellule cible ou dans un tissu cellulaire cible déterminé, ledit gène étant sous la dépendance des éléments nécessaires assurant son expression, après son transfert dans la cellule ou le tissu cellulaire cible.

Ainsi, par ligand on entend toute molécule qui est capable de reconnaître ledit récepteur et/ou d'inhiber sa fonction. Il peut s'agir, entre autres, d'un anticorps monoclonal ou d'un anticorps polyclonal ou d'un fragment d'anticorps monoclonal ou d'anticorps polyclonal. Il peut s'agir également d'une molécule inhibitrice de la fonction du récepteur dont la constante d'affinité serait plus grande que celle de la protéine Env HERV-W pour sa liaison et fixation au récepteur.

La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 : 495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux. Pour la production d'anticorps monoclonaux, un immunogène peut être couplé à de l'hémocyanine de Lymphet

Keyhole (peptide KLH) comme support pour l'immunisation ou à de l'albumine sérique (peptide SA). Les animaux sont soumis à une injection d'immunogène en utilisant de l'adjuvant complet de Freund. Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés sont analysés pour leur spécificité et leur sélectivité en utilisant des techniques classiques, telles que par exemple des tests ELISA ou de Western Blot. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Des anticorps monoclonaux peuvent également être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite, après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quelque soit le mode de production, en surnageant ou en ascite, les anticorps sont ensuite purifiés. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions et la chromatographie d'exclusion ou l'immunoprécipitation. Un nombre suffisant d'anticorps sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants. La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que des anticorps chimères produits par génie génétique est bien connue de l'homme du métier.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)₂, Fab, Fab', sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps natif (voir par exemple Arakawa et al., 1996, J. Biochem 120 : 657-662 et Chaudray et al., 1989, Nature 339 : 394-397).

Comme évoqué précédemment la thérapie génique ouvre la possibilité d'exprimer *in vivo* de tels ligands par l'administration de compositions thérapeutiques comprenant au moins un gène codant pour un tel ligand. Un tel gène d'intérêt thérapeutique code notamment (i) soit pour au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal ou un fragment d'anticorps monoclonal ou polyclonal ou encore pour un anticorps transmembranaire natif, ou un fragment d'un tel anticorps, pour autant que l'anticorps ou fragment d'anticorps soit exprimé *in vivo* à la surface d'une cellule cible ou de cellules cibles d'un tissu et soit capable de reconnaître et de se lier audit récepteur, (ii) soit pour au moins une molécule inhibitrice comme décrit ci-dessus.

Par cellules cibles ou cellules cibles d'un tissu, telles que définies ci-dessus, on entend (i) soit des cellules au niveau desquelles on veut intervenir pour

prévenir ou inhiber la formation de syncytia, (ii) soit des cellules autres mais qui sont susceptibles d'exprimer le ligand et par voie de conséquence d'inhiber et/ou de bloquer l'activité fonctionnelle du récepteur.

Par élément assurant l'expression *in vivo* dudit gène, on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer son expression, après transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule et éventuellement des séquences requises pour permettre l'expression à leur surface d'un polypeptide ou d'une molécule inhibitrice, tel qu'évoqué ci-dessus. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. Des exemples de tels promoteurs ont été décrits précédemment.

Par anticorps transmembranaire, on entend un anticorps dont au moins la région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer au récepteur est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre la reconnaissance et la fixation. De tels anticorps peuvent consister en des polypeptides de fusion comprenant une séquence d'acides aminés définissant la région fonctionnelle et une séquence d'acides aminés définissant un polypeptide transmembranaire qui permet l'ancrage au sein de la bicouche lipidique membranaire des cellules cibles ou à la surface externe de cette bicouche lipidique. Des séquences nucléiques codant pour de tels anticorps transmembranaires sont décrites dans la littérature.

Par gène ou séquence d'acide nucléique ou leurs fragments, on entend (i) un gène ou un acide nucléique natif isolé ou leurs fragments isolés obtenus par coupure enzymatique, ou (ii) un gène ou acide nucléique ou leurs fragments obtenu(s) par synthèse chimique à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que les synthétiseurs commercialisés par la société Applied Biosystems.

Par cellules tumorales, on entend (i) des cellules de lignées cellulaires immortalisées ou (ii) des cellules primaires tumorales prélevées chez un patient.

Par promoteur autologue, on entend un LTR 5' de HERV-W, à la condition qu'il soit fonctionnel et par promoteur hétérologue on entend tout promoteur n'appartenant pas à la famille de HERV-W, d'origine virale, rétrovirale ou cellulaire, éventuellement modifié, à la condition qu'il soit fonctionnel. Avantagusement, le

~~promoteur autologue ou hétérologue~~ est un promoteur fort c'est-à-dire qu'il est capable d'induire une expression quantitativement importante de la protéine ou du polypeptide.

Le pouvoir fusogène de la protéine Env HERV-W peut également être utilisé pour favoriser le processus d'adhésion cellulaire dans la cas de greffes hétérologues ou homologues ou dans des processus de réparation cellulaire.

Exemple 1 :

Lignées cellulaires:

La lignée TELCeB6 (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (12) : 7430-7436 (1995)) dérive de la lignée TELac2 après transfection et sélection clonale d'un plasmide d'expression destiné à produire des protéine Gag et Pol de type MoMLV (virus de la leucémie murine de Moloney). La lignée TELac2 dérive initialement des cellules humaines de rhabdomyosarcome TE671 (ATCC CRL 8805) et exprime le vecteur rétroviral rapporteur nlsLacZ (Takeuchi et al., Journal of Virology, 68 (12) : 8001-8007 (1994)). La production de particules rétrovirales infectieuses par les cellules TELCeB6 dépend des vecteurs d'expression d'enveloppe transfectés.

Ces cellules sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco modified Eagle medium - Life Technologies) avec 10% de sérum de veau foetal (Life Technologies). D'une manière générale, ce milieu a été utilisé pour tous les autres types cellulaires, i.e. les cellules TE671 (ATCC CRL 8805 - rhabdomyosarcome humain), A-431 (ATCC CRL-1555 - tumeur solide, carcinome épidermoïde humain), HeLa (ATCC CCL-2), COS (ATCC CRL-1651), PAE (cellules endothéliales d'aorte de porc), XC (ATCC CCL-165 - sarcome de rat), NIH-3T3 et QTB (ATCC CRL-1708).

Construction des vecteurs d'expression d'enveloppe :

Le plasmide pHCMV a été utilisé pour l'expression de *env* HERV-W. Le plasmide FBASALF-ARless a été utilisé en qualité de témoin positif de fusion; il produit une forme hautement fusogénique de la glycoprotéine d'enveloppe MLV amphotrope, modifiée par introduction d'un codon stop avant le premier acide aminé du peptide intracytoplasmique p2-R (Rein et al., Journal of Virology, 68 (3) : 1773-1781 (1994)). *env* HERV-W cloné en anti-sens dans le plasmide pHCMV a été utilisé comme témoin négatif.

Transfection et tests de fusion de cellule à cellule (coculture) :

Les plasmides d'expression des glycoprotéines d'enveloppe sont transfectés dans les cellules TELCeB6 par précipitation au phosphate de calcium (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (10) : 6314-6322 (1995)). Les cellules TELCeB6 confluentes exprimant Env sont fixées au Glutaraldéhyde à 0,5% en PBS, 24 h. après transfection. Une coloration par des solutions de May-Grünwald et Giemsa (MERCK) est alors effectuée selon les recommandations du fournisseur. Elle colore les noyaux en violet et les cytoplasmes en mauve et permet de visualiser les syncytia.

Pour les expériences de coculture, les cellules transfectées sont décrochées du support, comptées puis ré-ensemencées à concentration égale (3×10^5 cellules/puit) en plaques 6 puits. Des cellules fraîches indicatrices sont alors ajoutées aux cellules transfectées à raison de 10^6 cellules par puit et la co-culture est poursuivie pendant 24 h. Une coloration XGal (5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside peut alors être effectuée pour colorer le noyau des cellules TELCeB6 (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (10) : 6314-6322 (1995)). Elle est suivie d'une coloration par des solutions de May-Grünwald et Giemsa (MERCK) effectuée selon les recommandations du fournisseur.

La majorité des syncytia est observable 18 à 24 heures après le début de la transfection ; le décollement progressif des cellules ne permet plus d'observation, ni de coloration 36 heures après la transfection. La fusion observée correspond à une fusion "from within", c'est-à-dire à une fusion de cellule-à-cellule, à partir d'une cellule exprimant l'enveloppe, par opposition à une fusion "from without" qui correspond à une formation de syncytia consécutive à une fusion virion-cellule(s).

Le tableau I ci-après rassemble les résultats obtenus concernant la capacité de fusion de cellule à cellule de Env HERV-W par transfection directe, comparée à celle de l'enveloppe témoin ARless. Les cellules TELCeB6 et TE671 correspondent à des lignées d'origine humaine. Les cellules COS sont des cellules de rein de singe vert. Les cellules XC sont des cellules de rat.

Tableau I

Enveloppe	index* de fusion sur les cellules			
	TELCeB6	TE671	COS	XC
ARless	33	8,6	inn.	40
HERV-W	61	24,7	3,6	0

5 ^{a1}L'index de fusion correspond au pourcentage $(N-S)/T$, où N est le nombre de noyaux en syncytia, S est le nombre de syncytia et T est le nombre total de noyaux comptés. inn. signifie innombrables, organisés en "réseau".

10 Le tableau I montre que les résultats sont au moins aussi importants pour Env HERV-W que pour le témoin sur les cellules d'origine humaine. Ils sont moindres sur les cellules simiennes. Env HERV-W n'induit pas la formation de syncytia sur des cellules de rat.

15 Le tableau II ci-après rassemble les données observées dans des expériences de coculture de cellules indicatrices avec des cellules TELCeB6 transfectées par pHCMV-env HERV-W. Le type, l'origine et l'espèce des cellules indicatrices sont indiqués. La formation de syncytia est indiquée par les mentions oui/non.

5

Tableau II

Espèce	Type cellulaire	Origine	Fusion en co-culture avec TELCeB6
Homme	TE671	Rhabdomyosarcome	Oui
	A431	Carcinome épidermoïde	Oui
	HeLa	Carcinome épithélioïde	Oui
Singe	COS	Type fibroblastique	Oui
Porc	PAE	Endothélium	Oui
Rat	XC	Sarcome	Non
Souris	3T3	Fibroblastique	Non
Caille	QT6	Fibrosarcome	Non

Le tableau II détaille les résultats des expériences de coculture en fonction des lignées cellulaires testées. On observe des syncytia dans des cellules humaines de rhabdomyosarcome (TE671), de carcinome épidermoïde (A431) et de carcinome épithélioïde (HeLa), ainsi que dans des cellules de singe de type fibroblastique (COS), des cellules de porc d'endothélium (PAE) et des cellules de souris de type fibroblastique (3T3). Le fait que l'enveloppe endogène humaine Env HERV-W soit capable de fusionner dans des cellules de porc peut poser des problèmes dans le cadre de la transplantation d'organes (xénotransplantation).

Exemple 2 :

Amplification conjointe puis sélective de la LTR et de l'enveloppe:

Afin d'étudier le polymorphisme de la région codante de l'enveloppe et de la région promotrice U3 de la LTR 5' associée, situées sur le chromosome 7, une amplification spécifique d'un fragment de 10kb est réalisée grâce à un couple d'amorces spécifiques. En effet, sachant que la famille HERV-W comporte de nombreuses copies

non codantes et en particulier un nombre important de LTR, cette stratégie permet d'amplifier spécifiquement et conjointement la région *env* et sa séquence promotrice (LTR5') située en amont, exclusivement sur le chromosome 7. On utilise pour cela une amorce U6198 s'hybridant sur une séquence spécifique située en amont de la LTR 5' sur le chromosome 7, et une amorce L6186 s'hybridant de façon chevauchante sur la région U5 du LTR 3' et le gène cellulaire adjacent, sur ce même chromosome. La longue PCR (ou LD-PCR) est réalisée dans les conditions suivantes, 1 x 5 min. à 94°C, 10 x (10 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 8 min. à 68°C), 25 x (10 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 8 min. à 68°C + 10 sec /cycle), 1 x 7 min. à 68°C, en présence de tampon d'amplification (50 mM Tris HCL pH 9,0 à 25°C, 15mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100); 1,5 mM MgCl₂, 0,25mM de chaque dNTP, 330 nM de chaque amorce (U6198 et L6186), 1U d'ADN polymérase ainsi que 200ng de matrice (ADN génomique) dans un volume final de 50ml.

A partir de ce produit PCR de 10kb dilué, une PCR nichée "env" ainsi qu'une PCR nichée "LTR" sont effectuées, afin d'objectiver la présence ou non d'un polymorphisme de ces deux régions. La dilution permet une amplification spécifique à partir du produit de LD-PCR et non du matériel génomique de départ. La PCR nichée "env" est réalisée grâce aux amorces U6189 et L6186, l'amorce U6189 étant celle employée pour la LD-PCR, l'amorce U6189 étant située en amont de l'ATG de *env*. La région U3 du LTR 5' est amplifiée par le couple d'amorce U6460 et L5643. L'amorce U6460 s'hybride en amont de la LTR 5' tandis que l'amorce L5643 s'hybride dans le domaine R de la LTR 5'. Les PCR nichées sont réalisées dans les conditions suivantes, 1 x 5 min. à 94°C, 30 x (1 min. à 94°C, 1 min. à 53°C, 3 min. à 72°C), 1 x 7 min. à 72°C, en présence de tampon d'amplification (10 mM Tris HCL pH 8,3, 50mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,25mM de chaque dNTP, 330 nM de chaque amorce, 1,25U d'ADN polymérase, un aliquot du produit d'amplification de la LD-PCR, dans un volume final de 50ml.

Analyse du polymorphisme:

Afin d'objectiver la présence ou non d'un polymorphisme, les produits des PCR nichés peuvent être analysés de différentes façons, en particulier le séquençage ou l'analyse par la technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

~~permettant de mettre en évidence la présence d'au moins une mutation entre deux~~
~~séquences courtes d'une taille moyenne de 250pb.~~

Polymorphisme du gène *env*: l'utilisation de 20 amorces (10 amorces sens paires: 6302 à 6320 et 10 amorces anti-sens impaires: 6303 à 6321) permet le

5 séquençage de la région codante de l'enveloppe à partir du produit PCR nichée enveloppe. Ces amorces peuvent également être utilisées pour une analyse du polymorphisme par SSCP. A titre d'exemple, les séquences des gènes d'enveloppe de trois donneurs sains étiquetés D6, D10 et D21 sont illustrées à la figure 2. Ces séquences montrent l'existence d'un faible taux de polymorphisme. Si on utilise la

10 séquence d'enveloppe du donneur D6 comme référence arbitraire, la séquence de l'enveloppe du donneur D21 possède une mutation en position 386 (T386C), le remplacement de la thymine par la cytosine induisant un changement d'acide aminé de valine en alanine (V128A en numérotation protéique). De même, la séquence du gène de l'enveloppe du donneur D10 présente deux mutations par rapport à la séquence du

15 donneur D6, en position 671 (T671C) et 920 (G920A), induisant deux changements d'acides aminés, respectivement de valine en alanine (V224A en numérotation protéique) et de sérine en asparagine (S306N en numérotation protéique). Ces séquences illustrent l'existence d'un polymorphisme. Le séquençage de 12 ADN de patients a été réalisé et nous a permis d'observer un faible taux de polymorphisme entre

20 les ADN testés. Par exemple, la comparaison des séquences issues de deux individus notés 10 et 21 montre la présence de trois bases de différence en acides nucléiques sur les 1617 bases du gène, ce qui correspond à un taux de polymorphisme de 0,19%. Deux mutations sont situées sur la séquence de l'ADN 10 (T671C et G920A) et une sur la séquence de l'ADN 21 (T386C). La séquence de l'individu 6 sert de référence. Cette

25 même analyse au niveau protéique permet d'observer 3 acides aminés mutés pour l'enveloppe entière comportant au total 538 acides aminés, soit un taux de polymorphisme de 0,56%. Les deux mutations de la séquence issue de l'individu 10 sont V224A et S306N et celle de la séquence issue de l'individu 21 est V128A.

Polymorphisme de la région promotrice U3 de la LTR5' associée au gène

30 d'enveloppe: le séquençage du domaine U3 du LTR 5' est réalisé grâce aux 2 amorces précédemment utilisées pour la PCR nichée LTR. A titre d'exemple, les séquences de la région U3 de la LTR5' (associée au gène de l'enveloppe) de deux des donneurs sains

(étiquetés D6 et D21) pour lesquels l'enveloppe a par ailleurs été séquencée sont illustrées à la figure 3. Ces séquences montrent l'existence d'un taux de polymorphisme plus important que pour le gène de l'enveloppe. On notera en particulier les variations aux positions 210 (T pour D6, C pour D21), 211 (G pour D6, A pour D21), 229 (A pour D6, G pour D21), 231 (T pour D6, C pour D21), 232 (C pour D6, A pour D21)

Les séquences des amorces utilisées pour la PCR, le SSCP et la séquençage sont illustrées dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III

NOM :	SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES:
	Amorces PCR longue
U6198 :	5'- CAA-AAC-GCC-TGG-AGA-TAC-AGC-AAT-TAT-C-3'
L6186 :	5'- GCA-CCC-TCA-TGG-TTG-TGT-TAC-TTG-G-3'
	Amorces PCR nichée env
U6189 :	5'- CTG-AAA-ATC-CAG-GAG-ACA-ACG-CTA-GC-3'
L6186 :	5'- GCA-CCC-TCA-TGG-TTG-TGT-TAC-TTG-G-3'
	Amorces PCR nichée LTR 5'
U6460 :	5'- TTG-GTA-CCC-AAA-ACG-CCT-GGA-GAT-ACA-GCA-ATT-ATC-3'
L5643 :	5'- AAC-TCG-AGT-GAA-ATA-GCA-TGA-AAA-CAG-AG-3'
	Amorces SSCP et séquençage env:
U6302 :	5'- AGG-AAA-GTA-ACT-AAA-ATC-ATA-AAT-C-3'
L6303 :	5'- GGT-TCC-CTT-AGA-AAG-ACT-CC-3'
U6304 :	5'- AAT-ATT-GAT-GCC-CCA-TCG-TAT-A-3'
L6305 :	5'- CCA-GTT-TGG-GTG-AAG-TAA-GTC-3'

U6306 :	5'- GGA-GGA-CTT-GGA-GTC-ACT-GTC-3'
L6307 :	5'- AGG-CGA-GTA-TGG-GTA-CGG-AG-3'
U6308 :	5'- GGA-CTA-GAT-CTC-TCA-AAA-CTA-CA-3'
L6309 :	5'- ACG-GAA-GTG-GTG-TTT-ATT-TCT-G-3'
U6310 :	5'- CCT-GAA-CAA-TGG-AAC-AAC-TTC-3'
L6311 :	5'- ATT-CCT-GAG-GGT-AGG-CAG-AC-3'
U6312 :	5'- GGT-AAC-TCC-TCC-CAC-ACA-AA-3'
L6313 :	5'- GAA-TGG-GTA-CTC-TTT-TGT-TGC-3'
U6314 :	5'- TAC-AGT-TAT-GTC-ATA-TCT-AAG-CC-3'
L6315 :	5'- TAA-GTT-GAT-CTT-GCA-AGG-TGA-C-3'
U6316 :	5'- CTA-AAT-GGG-GAC-ATG-GAA-CG-3'
L6317 :	5'- TAT-TCG-ATC-TGG-AAT-TTC-TTC-AAC-3'
U6318 :	5'- CAA-TCC-GGA-ATC-GTC-ACT-GA-3'
L6319 :	5'- AGA-CAA-AGT-TAA-CAA-GGA-GGT-TC-3'
U6320 :	5'- ACT-CCT-CTT-TGG-ACC-CTG-TAT-C-3'
L6321 :	5'- GAG-GTT-GGC-CGA-CCA-CCG-3'

U fait référence à des amorces sens et L fait référence à des amorces réverses.

Exemple 3 :

Afin de déterminer le récepteur reconnu par la glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W parmi les récepteurs connus comme étant exprimés dans les cellules humaines, c'est à dire PiT-2 (le récepteur des MLV amphotropes), PiT-1 (le récepteur des GALV -gibbon ape leukemia virus et FeLV-B -feline leukemia virus type B) et hATB° (le récepteur des rétrovirus mammifères de type D également reconnu par le rétrovirus RD114), des tests d'interférence ont été réalisés. Pour cela, des cellules TELCeB6 ont été transfectées, soit avec le plasmide d'expression codant pour l'enveloppe HERV-W, soit avec le plasmide d'expression exprimant l'ARN messager anti-sens du gène codant pour l'enveloppe HERV-W, soit avec le plasmide d'expression codant pour un variant hyperfusogénique de l'enveloppe MLV amphotrope nommé ARless. Ces cellules, appelées "cellules productrices" ont ensuite été co-cultivées avec des cellules humaines, dites "cellules indicatrices", exprimant le récepteur de

l'enveloppe HERV-W et qui expriment, de plus, de manière stable, soit l'enveloppe du GALV, soit l'enveloppe du MLV amphotrope, soit l'enveloppe du RD114. L'expression des ces diverses glycoprotéines d'enveloppe sur ces cellules est capable de reconnaître les récepteurs correspondants, de les bloquer et donc de diminuer leur capacité à interagir avec une glycoprotéine d'enveloppe rétrovirale correspondante, mais exprimée de manière exogène, à la surface des cellules "productrices". Ainsi, si lors des tests de fusion par co-culture, on observe une diminution dans la formation de syncytia pour un type cellulaire indicateur bloquant un de ces récepteurs par comparaison à la cellule indicatrice parentale pour laquelle l'ensemble des trois récepteurs potentiels est pleinement accessible, on pourra en déduire la nature du récepteur reconnu par l'enveloppe exprimée sur la cellule productrice. Après deux jours de co-culture, les cellules ont été fixées, colorées, et les indices de fusion déterminés. Les résultats sont présentés dans le tableau IV ci-dessous.

Tableau IV

Protéine d'enveloppe exprimée dans les cellules productrices.	Protéines d'enveloppe exprimées dans les cellules indicatrices.			
	Témoin	MLV-A	GALV	RD114
ARless	+	-	+	+
anti-sens HERV-W	-	-	-	-
HERV-W	+	+	+	-

- signifie une absence de syncytia et + signifie la présence de syncytia

Témoin signifie qu'il n'y a pas de protéine d'enveloppe exprimée dans cette cellule.

Ces résultats permettent de déduire que la glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W reconnaît le récepteur hATB^o des rétrovirus mammifères de type D. En effet, alors que cette enveloppe est fusogénique pour les cellules indicatrices parentales ou pour les cellules indicatrices exprimant, soit l'enveloppe MLV-A, soit l'enveloppe GALV, on n'observe pas de syncytia quand les cellules productrices exprimant la

glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W sont co-cultivée avec les cellules indicatrices exprimant l'enveloppe RD114.

Exemple 4 : Contrôle de l'activité fusogène de HERV-W Env par sa partie
5 cytoplasmique.

L'implication de la partie cytoplasmique de HERV-W Env dans l'activité fusogène de cette glycoprotéine est démontré par la construction et la caractérisation des glycoprotéines recombinantes suivantes :

W/CD46+, dérivé du CD46 humain, facteur de protection des cellules vis-
10 à-vis du complément et non impliqué dans la formation de syncytia, comportant l'ectodomaine et le domaine transmembranaire de HERV-W Env (aa 1 à 469) fusionnés au domaine cytoplasmique du CD46 (aa 335 à 369). Cette molécule chimère n'est pas fusogénique dans un test de fusion cellule-cellule (Figure 5).

W/R+, dérivé de la glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus MLV-A
15 (amphotropic murine leukemia virus), non fusogénique quand exprimée indépendamment des autres protéines de MLV-A, comportant l'ectodomaine et le domaine transmembranaire de HERV-W Env (aa 1 à 469) fusionnés au domaine cytoplasmique de la glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus MLV-A (aa 622 à 654). Cette molécule chimère n'est pas fusogénique dans un test de fusion cellule-cellule
20 (Figure 5).

RD/W, dérivé de la glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus endogène félin RD114, non fusogénique quand exprimée indépendamment des autres protéines du RD114, comportant le domaine cytoplasmique et le domaine transmembranaire de
25 HERV-W Env (aa 448 à 538) fusionnés à l'ectodomaine de la glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus RD114 (aa 1 à 508). Cette molécule chimère est fusogénique dans un test de fusion cellule-cellule (Figure 5).

La figure 5 annexée représente le schéma et la caractérisation des chimères Env HERV-W précitées et les résultats obtenus dans un test de fusion cellule-cellule.

30 L'ectodomaine de HERV-W Env est défini par le polypeptide dérivé du précurseur protéique contenant les acides-aminés (aa) 21 à 447; le domaine transmembranaire, les aa 448 à 469 et la partie cytoplasmique, les aa 470 à 538 (Blond

et al., (1999) Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *Journal of Virology*. 73:1175-1185).

L'ectodomaine de CD46 est défini par le polypeptide dérivé du précurseur protéique contenant les acides-aminés (aa) 35 à 312; le domaine transmembranaire, les
5 aa 313 à 334 et la partie cytoplasmique, les aa 335 à 369 (Yant et al., (1997), Identification of a cytoplasmic Tyr-X-X-Leu motif essential for down regulation of the human cell receptor CD46 in persistent measles virus infection. *J Virol*. 71:766-770).

L'ectodomaine de MLV-A Env est défini par le polypeptide dérivé du précurseur protéique contenant les acides-aminés (aa) 32 à 598; le domaine
10 transmembranaire, les aa 599 à 621 et la partie cytoplasmique, les aa 622 à 654 (Ott et Rein, (1990), Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia virus: close relationship to mink cell focus forming viruses. *J Virol*. 64:757-766).

L'ectodomaine de RD114 Env est défini par le polypeptide dérivé du précurseur protéique contenant les acides-aminés (aa) 18 à 508; le domaine
15 transmembranaire, les aa 509 à 530 et la partie cytoplasmique, les aa 531 à 564 (Cosset et al., (1995b), High titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol*. 69:7430-7436).

SU signifie sous-unité de surface; TM sous-unité transmembranaire; SP peptide signal; tm domaine d'ancrage transmembranaire; cyt partie cytoplasmique;
20 RBD domaine de liaison au récepteur; PRR région riche en proline; C domaine carboxy-terminal de la SU.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, caractérisé en ce que la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1 ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1, et en ce qu'on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture cellulaire, par la mise en évidence de la formation de syncytia.
2. Procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, caractérisé en ce que la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1, et en ce qu'on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine dans des cellules d'un tissu cellulaire, ou d'une culture cellulaire par la mise en évidence de la formation de syncytia.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la protéine est codée par le gène *env* du rétrovirus endogène HERV-W.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la protéine est codée par un cadre de lecture ouvert situé sur le chromosome 7 du génome humain.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la protéine présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la protéine présente une séquence polypeptidique qui consiste en SEQ ID NO:1.
7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO : 1.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO:1.

9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui consiste en la séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO:1.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules dudit tissu ou de ladite culture cellulaire sont choisies parmi les cellules osseuses, les cellules musculaires, les cellules placentaires, les cellules endothéliales, en particulier des vaisseaux sanguins, les cellules épithéliales, les cellules gliales et les cellules tumorales ou issues de lignées cellulaires tumorales.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la détection du pouvoir fusogène de ladite protéine consiste à :
obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort,

transfecter des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine, et
observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la détection du pouvoir fusogène de la protéine consiste à :

obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort,

transfecter des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine,

co-cultiver des cellules naïves indicatrices exprimant à leur surface un récepteur de ladite protéine en présence desdites cellules productrices, et

observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

13. Utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1, 6 ou 9, dans des conditions appropriées permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement de cancers.

15. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ladite composition est destinée à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

16. Utilisation selon la revendication 13, 14 ou 15, caractérisée en ce que la composition est destinée à un traitement par thérapie génique.

17. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

18. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

19. Vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 9, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte.

20. Cellule hôte comprenant au moins un vecteur selon la revendication 19.

21. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression selon la revendication 19.

22. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 17, 18 et 19, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de cancers par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia.

23. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 17, 18 et 19, pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

24. Utilisation d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9 dans un vecteur de thérapie génique, ledit vecteur de thérapie génique comprenant, entre autres, une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

25. Vecteur de thérapie génique comprenant une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

26. Vecteur selon la revendication 25, choisi parmi un vecteur rétroviral de type MLV, un vecteur lentiviral pseudotypés par une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9, un vecteur synthétique.

27. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de thérapie tel que défini dans l'une des revendications 25 et 26 et une séquence d'acide nucléique ou un oligonucléotide anti-sens.

28. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de thérapie tel que défini dans l'une des revendications 25 et 26 et un gène d'intérêt thérapeutique.

29. Cellule exprimant une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

30. Utilisation d'une cellule selon la revendication 29, comme vecteur cellulaire.

31. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, une cellule ou vecteur cellulaire tel que défini dans les revendications 29 et 30.

32. Procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses ou de systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9, selon lequel on met en contact ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-drogue avec des

cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, on observe une régression ou une disparition dans la formation de syncytia.

33. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, une séquence d'acide nucléique ou un oligonucléotide anti-sens susceptible de s'hybrider à un gène ou un fragment de gène ou à un acide nucléique ou fragment d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

34. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un ligand susceptible de reconnaître et de se lier au récepteur de la protéine définie en SEQ ID NO : 1.

35. Composition thérapeutique selon la revendication 34 comprenant au moins un ligand choisi parmi un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un anticorps transmembranaire ou un fragment desdits anticorps, une molécule inhibitrice, ledit ligand étant spécifique du récepteur de la protéine définie en SEQ ID NO : 1.

36. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un gène d'intérêt thérapeutique, ledit gène codant pour un ligand tel que défini dans la revendication 35 et étant placé sous le contrôle des éléments nécessaires pour assurer son expression *in vivo*.

37. Vecteur de thérapie génique comprenant à sa surface le récepteur de la protéine identifiée en SEQ ID NO : 1, notamment pour cibler des cellules produisant la protéine identifiée en SEQ ID NO : 1 de façon constitutive ou induite.

FIG. 1

Consensus	HALPYHIFL TVLLPSETLT APPPCRCMTS SSPYQEFLLR MORQONIDAP SYRSLKGTPT TTAHTHMPR NCYHSATLON HANTHYWTK MINPSCRGGL	100
P Env ADN 10	100
P Env ADN 21	100
P Env ADN 6	100
Consensus	GVTVCMYFT QTCHSDGGV QDQAREKVK EVISQLTRVH QTSSPYKGLD LSKLHETLRT HTRLVSLFNT TLTGLEHESA QNPTNCWICL PLNFRPYVSI	200
P Env ADN 10	200
P Env ADN 21A.....	200
P Env ADN 6	200
Consensus	PVPEQWNFS TEINTSVLV GPLVSNLEIT HTSNLTCVKF SNVTVTNSQ CIRWTPPTQ IVCLPSGIFV VCGTSAYRCL NGSSSHCFL SFLVPPMTIY	300
P Env ADN 10A.....	300
P Env ADN 21	300
P Env ADN 6	300
Consensus	TEQDLYSYVI SKPRKRVPI LPFVIGAGVL GALTGIGGI TTSTOFYVKL SQELNGOMER VADSLVTLD QINSLAAVVL QNRALDILT AERGTCLEL	400
P Env ADN 10N.....	400
P Env ADN 21	400
P Env ADN 6	400
Consensus	GEECCYVNO SGIVTEKVK IRDRIQRAE ELRNTQPMGL LQWHPILP FLGLPAAIIL LLLFGPCIFN LWNFVSSRI EAVKLQMEPK MQSKTKIYRR	500
P Env ADN 10	500
P Env ADN 21	500
P Env ADN 6	500
Consensus	PLDRPASPRS DVNDIKGTPP EEISAAQPLL RENSAGSS	538
P Env ADN 10	538
P Env ADN 21	538
P Env ADN 6	538

FIG. 2

Consensus	ATGAGTATC CTATATCAT TTTTCTCTTT TACGCTCTTT GACTCTCAT GAGAGGCTC CATGCGCTG TATGACAGT AGCTGCGCTT ACCGAGAGT TCTATGAGA	120
Env ADN 6	120
Env ADN 10	120
Env ADN 21	120
Consensus	ATGAGGCTC TCGGAAATAT TGAATGCGA GTCTTTCTTA GCGAACGCG ACCTTCATG CCGACACCA TATGCGCGC AGCTGCTATC ACTCTGCGAC TCTTTGCGATG	240
Env ADN 6	240
Env ADN 10	240
Env ADN 21	240
Consensus	CATGCAATA CTCATTATG GAGAGGAAA ATGATTAATC CTAGTTCTCC TCGAGGCTT GAGTCACTG TCTGTTGAC TTACTTTGAC CAAGCTGTA TGTCTGATG GGGTGGAGTT	360
Env ADN 6	360
Env ADN 10	360
Env ADN 21	360
Consensus	CAAGTACG GAGAGGAAA ACGTGTAAA GAGTAAATCT CCGAACTGAC CCGGTACAT GCGACCTCTA GCGCTTACA AGGACTAGAT CTCTGAAAC TACATGAAAC CTTCCGTACG	480
Env ADN 6	480
Env ADN 10	480
Env ADN 21	480
Consensus	CATCTGCG TGTAAAGCT ATTAAATAC ACCCTCATG GGTCTGCGA GGTCTGCGC CAAGACCTA CTAACTCTT GATATGCTC CCGCTGAAT TGAAGCAT TGTTCGAATC	600
Env ADN 6	600
Env ADN 10	600
Env ADN 21	600
Consensus	CGTCTACTG AACATGCGA CACTCTGAC AGAGAAATAC AGACCTCTC GCTTTAGTA GAGCTCTTG TTTCATCT GGAATTAAC CATACCTCA ACCCTGCTG TGTAAATTT	720
Env ADN 6	720
Env ADN 10	720
Env ADN 21	720
Consensus	AGCATACTA CATACGAC CACTCTGCA TCGATGAGT GGTAACTCC TCGACAGAA ATAGCTGCC TACCTGAGS AAATATTTT GTCTGTGTA CTTGAGCTA TGTGTTTGG	840
Env ADN 6	840
Env ADN 10	840
Env ADN 21	840
Consensus	ATGCGCTCT GAGATCTAT GTGCTTCTC TCGCTCTTAG TCGCGCTAT GACATCTAC ACTGAAACG ATTATACAT TTATGCTA TGTAGGCTC GGAACAAAG AGTACCGATT	960
Env ADN 6	960
Env ADN 10	960
Env ADN 21	960
Consensus	CTTCTCTTG TTATGAGAC AGAGTCTA GTTACGCTAG GTTACGCTAT TCGCTATC AGACCTCTA CTCAGTCTA CTACAACTA TCTGAGAC TAAATGCGA CATGGAACG	1080
Env ADN 6	1080
Env ADN 10	1080
Env ADN 21	1080
Consensus	GTGCGGACT CCGTGGCTAC CTTCGAGAT CACTTAATC CCGTAGGAC AGTAGCTCT CAATATGCA GAGCTTAGA CTTCCTAAC GCTGAAGAG GCGGAACCTG TTTATTTTAA	1200
Env ADN 6	1200
Env ADN 10	1200
Env ADN 21	1200
Consensus	GCGGAAGAT GCTTATTA TGTATATCA TCGGAAATC TCACTGAG AAATTAGCA ATTGAGATC GAATACAG TACAGAGAG GAGCTTCGA ACATGAGAC CTGGGCGCTC	1320
Env ADN 6	1320
Env ADN 10	1320
Env ADN 21	1320

FIG. 2 suite

Consensus	CTCAGCCAAT	GGATGCCCTG	GATTCGCC	TTCCTAGGAC	CTCTAGGAGC	TATTAATATG	CTACTCTCT	TTCGACCCCTG	TATCTTTAAC	CTCCTTGTTA	ACTTGTCTC	TTCAGAATC	1440
Env ADN 6	1440
Env ADN 10	1440
Env ADN 21	1440
Consensus	GAAAGCTGTAA	AATCAAAAT	GGAGGCCAAG	ATGCGATCCA	AGACTAAGAT	CTACCGGAGA	CCCTGGACC	GGCTCTCTAG	CCACGATCT	GATGTTAATG	ACATCAAAGG	CACCCCTCT	1560
Env ADN 6	1560
Env ADN 10	1560
Env ADN 21	1560
Consensus	GAGGAAATCT	CAGCTGCACA	ACCTCTACTA	CGCCCCAATT	CAGCAGGAG	CAGTTAG							1617
Env ADN 6							1617
Env ADN 10							1617
Env ADN 21							1617

Fig. 3

Consensus	TCAGAGACAG GACTAGCTGG ATTTCCTAGG CGACTAAGA ATCCCTAAGC CTAGCTGGG ARGTGACCAC GTCACCTTT AAACAGGGG CTTCGACTT	100
LTR6 c1A	100
LTR21 c1S	100
Consensus	AGCTCACCC TGACCAATCA GAGAGCTCAG TAAATGCTA ATTAGGCAAA GACGGGGGT AAAGAATAG CCAATCATCT ATTGCCTGAG AGCAGAGAG	200
LTR6 c1A	200
LTR21 c1S	200
Consensus	GAGGGACAA YATCGGATA TAAACCCAG YMTTGAGCY GGCAC	246
LTR6 c1AT G.....A. TC.....C.....	246
LTR21 c1SC A.....G. CA.....T.....	246

FIG. 4

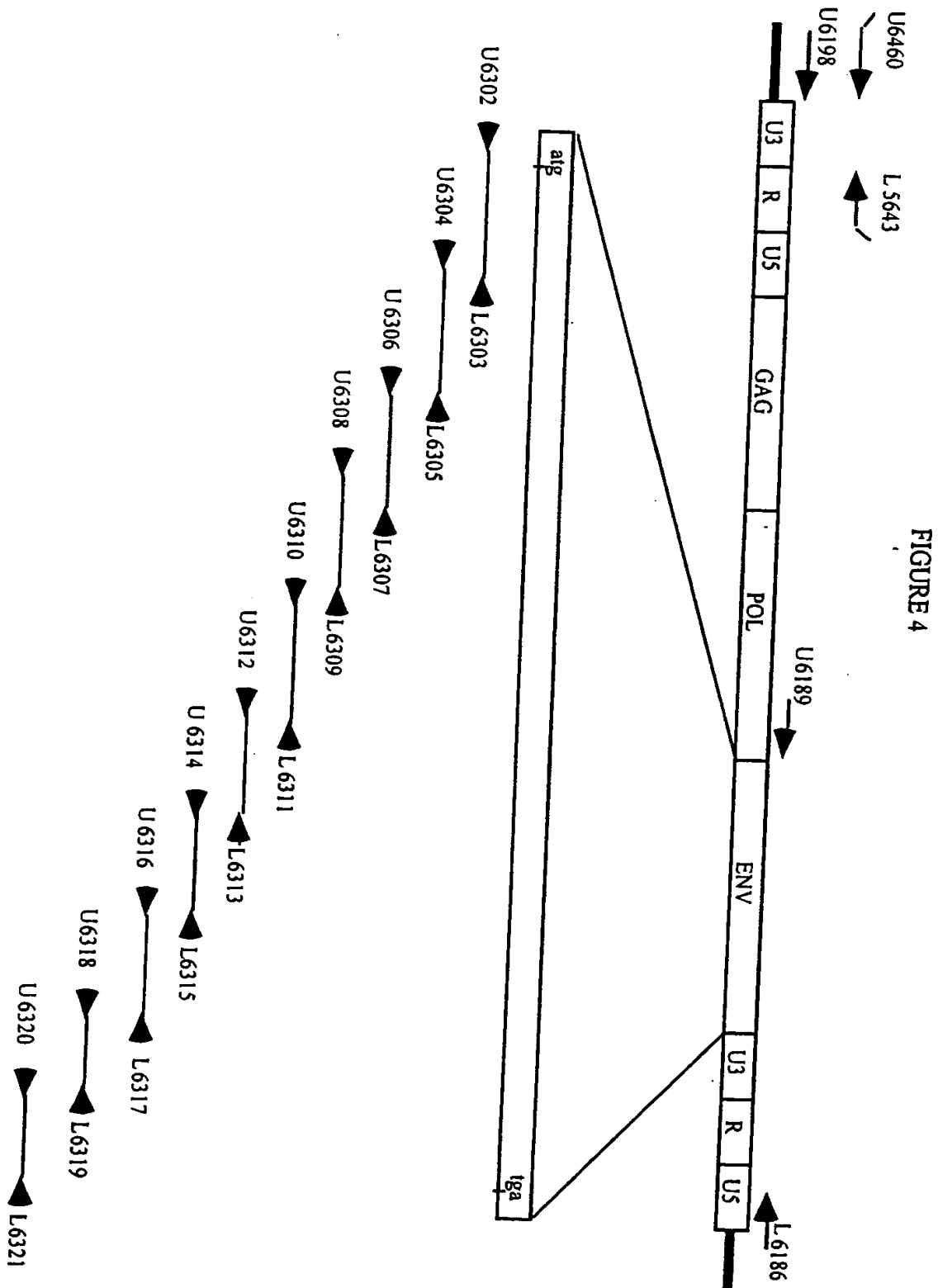


FIG. 5

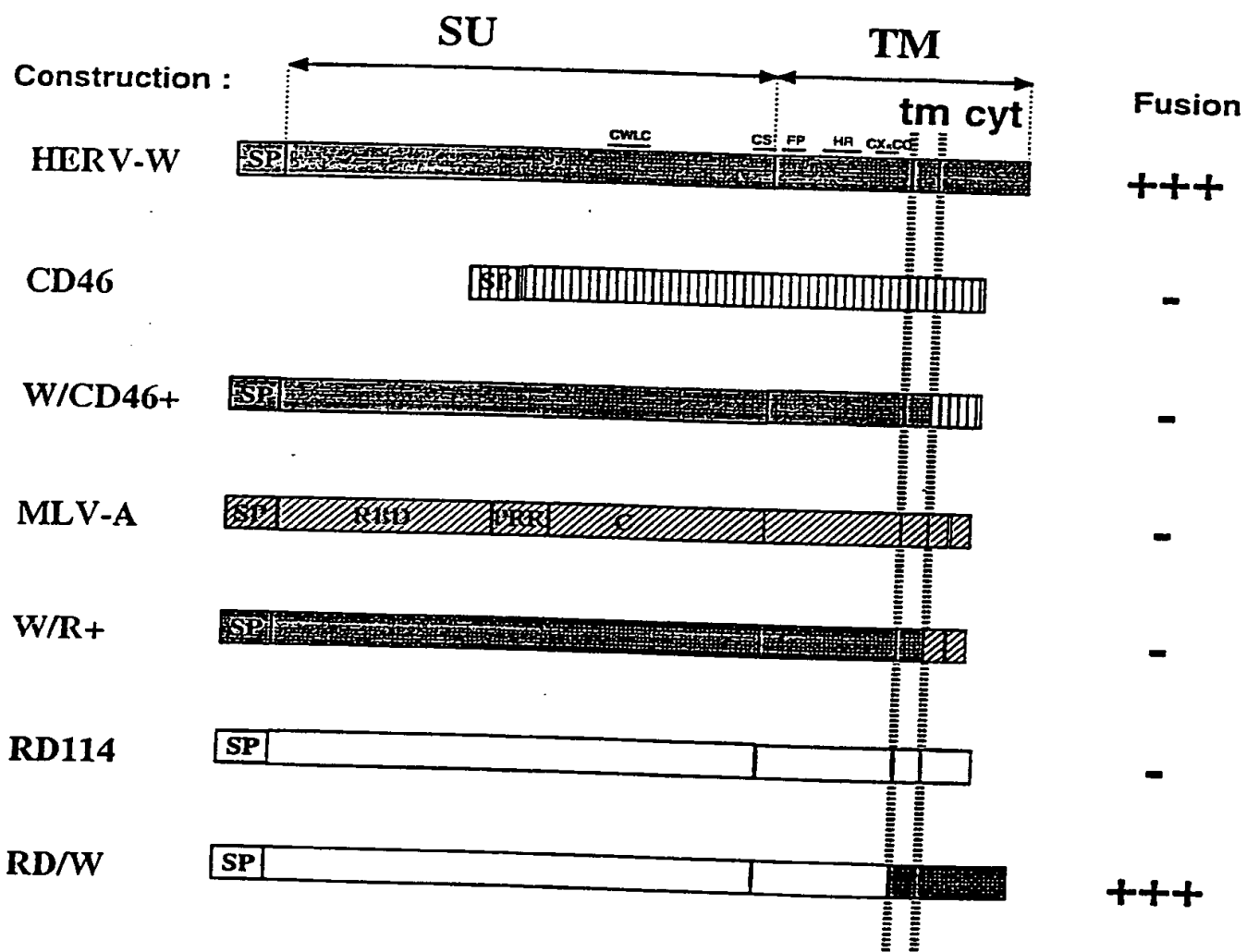


Figure XXX. Schéma et caractérisation des Env HERV-W chimères.

LISTE DE SEQUENCES

<110> BIO MERIEUX

5 <120> Procédé de détection de l'expression d'une protéine
d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain et
utilisations d'un gène codant pour cette protéine

10 <130> Pouvoir fusogène de env de ERV-W

<140>

<141>

<160> 2

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 538

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

25 Met Ala Leu Pro Tyr His Ile Phe Leu Phe Thr Val Leu Leu Pro Ser
1 5 10 15

Phe Thr Leu Thr Ala Pro Pro Pro Cys Arg Cys Met Thr Ser Ser Ser
20 25 30

30 Pro Tyr Gln Glu Phe Leu Trp Arg Met Gln Arg Pro Gly Asn Ile Asp
35 40 45

Ala Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Ser Lys Gly Thr Pro Thr Phe Thr Ala
50 55 60

35

His Thr His Met Pro Arg Asn Cys Tyr His Ser Ala Thr Leu Cys Met
65 70 75 80

40 His Ala Asn Thr His Tyr Trp Thr Gly Lys Met Ile Asn Pro Ser Cys
85 90 95

Pro Gly Gly Leu Gly Val Thr Val Cys Trp Thr Tyr Phe Thr Gln Thr
 100 105 110

5 Gly Met Ser Asp Gly Gly Gly Val Gln Asp Gln Ala Arg Glu Lys His
 115 120 125

Val Lys Glu Val Ile Ser Gln Leu Thr Arg Val His Gly Thr Ser Ser
 130 135 140

10 Pro Tyr Lys Gly Leu Asp Leu Ser Lys Leu His Glu Thr Leu Arg Thr
 145 150 155 160

His Thr Arg Leu Val Ser Leu Phe Asn Thr Thr Leu Thr Gly Leu His
 15 165 170 175

Glu Val Ser Ala Gln Asn Pro Thr Asn Cys Trp Ile Cys Leu Pro Leu
 180 185 190

20 Asn Phe Arg Pro Tyr Val Ser Ile Pro Val Pro Glu Gln Trp Asn Asn
 195 200 205

Phe Ser Thr Glu Ile Asn Thr Thr Ser Val Leu Val Gly Pro Leu Val
 210 215 220

25 Ser Asn Leu Glu Ile Thr His Thr Ser Asn Leu Thr Cys Val Lys Phe
 225 230 235 240

Ser Asn Thr Thr Tyr Thr Thr Asn Ser Gln Cys Ile Arg Trp Val Thr
 30 245 250 255

Pro Pro Thr Gln Ile Val Cys Leu Pro Ser Gly Ile Phe Phe Val Cys
 260 265 270

35 Gly Thr Ser Ala Tyr Arg Cys Leu Asn Gly Ser Ser Glu Ser Met Cys
 275 280 285

Phe Leu Ser Phe Leu Val Pro Pro Met Thr Ile Tyr Thr Glu Gln Asp
 290 295 300

40

Leu Tyr Ser Tyr Val Ile Ser Lys Pro Arg Asn Lys Arg Val Pro Ile
 305 310 315 320

5 Leu Pro Phe Val Ile Gly Ala Gly Val Leu Gly Ala Leu Gly Thr Gly
 325 330 335

Ile Gly Gly Ile Thr Thr Ser Thr Gln Phe Tyr Tyr Lys Leu Ser Gln
 340 345 350

10 Glu Leu Asn Gly Asp Met Glu Arg Val Ala Asp Ser Leu Val Thr Leu
 355 360 365

Gln Asp Gln Leu Asn Ser Leu Ala Ala Val Val Leu Gln Asn Arg Arg
 370 375 380

15 Ala Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Arg Gly Gly Thr Cys Leu Phe Leu
 385 390 395 400

Gly Glu Glu Cys Cys Tyr Tyr Val Asn Gln Ser Gly Ile Val Thr Glu
 20 405 410 415

Lys Val Lys Glu Ile Arg Asp Arg Ile Gln Arg Arg Ala Glu Glu Leu
 420 425 430

25 Arg Asn Thr Gly Pro Trp Gly Leu Leu Ser Gln Trp Met Pro Trp Ile
 435 440 445

Leu Pro Phe Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ile Ile Leu Leu Leu Phe
 450 455 460

30 Gly Pro Cys Ile Phe Asn Leu Leu Val Asn Phe Val Ser Ser Arg Ile
 465 470 475 480

Glu Ala Val Lys Leu Gln Met Glu Pro Lys Met Gln Ser Lys Thr Lys
 35 485 490 495

Ile Tyr Arg Arg Pro Leu Asp Arg Pro Ala Ser Pro Arg Ser Asp Val
 500 505 510

40 Asn Asp Ile Lys Gly Thr Pro Pro Glu Glu Ile Ser Ala Ala Gln Pro

515

520

525

Leu Leu Arg Pro Asn Ser Ala Gly Ser Ser
530 535

5

<210> 2

<211> 2781

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

15 atgggagctg ttttcatgct atttcactct attaaatctt gcaactgcac tcttctggtc 60
catgtttctt acggctcgag ctgagctttt gctcaccgtc caccactgct gtttgccacc 120
accgcagacc tgccgctgac tcccatccct ctggatcctg cagggtgtcc gctgtgctcc 180
tgatccagcg aggcgcccac tgccgctccc aattgggcta aaggcttgcc attgttcctg 240
cacggctaag tgccctgggtt tgttctaatt gagctgaaca ctagtcaactg gggtccatgg 300
ttctcttctg tgacccacgg cttctaatag aactataaca cttaccacat ggcccaagat 360
20 tccattcctt ggaatccgtg aggccaagaa ctccagggtca gagaatacga ggcttgccac 420
catcttgga gggcctgct accatcttg aagtgggtca ccaccatctt gggagctctg 480
tgagcaagga cccccggta acattttggc aaccacgaac ggacatccaa agtgatacat 540
cctgggaagg accctaccca gtcattttat ctaccccaac tgcggttaaa gtggctggag 600
tgaggtcttg gatacatcac acttgagtca aatcctggat actgccaag gaacctgaaa 660
25 atccaggaga caacgctagc tattcctgtg aacctctaga ggatttgcg ctgctcttca 720
aacaacaacc aggaggaaag taactaaaat cataaatccc catggccctc cttatcata 780
ttttctctt tactgttctt ttaccctctt tcaactctac tgcaaccctc ccatgccgct 840
gtatgaccag tagtccctt taccaagagt ttctatggag aatgcagcgt cccggaaata 900
ttgatgcccc atcgtatagg agtctttcta agggaacccc caccttcaact gccacacccc 960
30 atatgccccg caactgctat cactctgcca ctctttgcat gcatgcaaat actcattatt 1020
ggacaggaaa aatgattaat cctagtgtgc ctggaggact tggagtcaact gtctgttgga 1080
cttacttcac ccaaactgg atgtctgatg ggggtggagt tcaagatcag gcaagagaaa 1140
aacatgtaaa agaagtaatc tcccaactca cccgggtaca tggcacctct agcccctaca 1200
aaggactaga tctctcaaaa ctacatgaaa cctccgtac ccatactcgc ctggtaagcc 1260
35 tatttaatac caccctcaact gggctccatg aggtctcggc ccaaaaccct actaactgtt 1320
ggatatgcct cccctgaac ttcaggccat atgtttcaat ccctgtacct gaacaatgga 1380
acaacttcag cacagaaata aacaccactt ccgttttagt aggacctctt gtttccaatc 1440
tggaataaac ccatacctca aacctcacct gtgtaaaatt tagcaatact acatacacia 1500
ccaactccca atgcatcagg tgggtaactc ctcccacaca aatagtctgc ctaccctcag 1560
40 gaatatTTTT tgtctgtggt acctcagcct atcgttggtt gaatggctct tcagaatcta 1620

tgtgcttctt ctcattctta gtgcccccta tgaccatcta cactgaacaa gatttatata 1680
gttatgtcat atctaagccc cgcaacaaaa gagtacccat tcttcctttt gttataggag 1740
cgggagtgct aggtgcaacta ggtactggca ttggcggtat cacaacctct actcagttct 1800
actacaaact atctcaagaa ctaaattgggg acatggaacg ggtcgccgac tccctgggtca 1860
5 ccttgcaaga tcagcttaac tccctagcag cagtagtcct tcaaaatcga agagcttttag 1920
acttgctaac cgctgaaaga gggggaacct gtttattttt aggggaagaa tgctgttatt 1980
atgttaatca atccggaatc gtcactgaga aagttaaaga aattcgagat cgaatacaac 2040
gtagagcaga ggagcttcga aacactggac cctggggcct cctcagccaa tggatgccct 2100
ggattctccc cttcttagga cctctagcag ctataatatt gctactcctc tttggaccct 2160
10 gtatctttta cctccttggt aactttgtct cttccagaat cgaagctgta aaactacaaa 2220
tggagcccaa gatgcagtcc aagactaaga tctaccgcag acccctggac cggcctgcta 2280
gcccacgata tgatgttaat gacatcaaag gcacccctcc tgaggaaatc tcagctgcac 2340
aacctctact acgcccgaat tcagcaggaa gcagttagag cggtcgtcgg ccaacctccc 2400
caacagcact taggttttcc tgttgagatg ggggactgag agacaggact agctggattt 2460
15 cctaggctga ctaagaatcc ctaagcctag ctgggaaggt gaccacatcc acctttaaac 2520
acggggcctt caacttagct cacacctgac caatcagaga gctcactaaa atgctaatta 2580
ggcaaagaca ggaggtaaag aaatagccaa tcatctattg cctgagagca cagcaggagg 2640
gacaatgata gggatataaa cccaagtctt cgagccggca acggcaaccc cctttgggtc 2700
ccctcccttt gtatgggagc tctgttttca tgctatttca ctctattaaa tcttgcaact 2760
20 gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2781